

**Induktion regulatorischer T-Zellen zur
Inhibition allergenspezifischer Immunantworten im
Mausmodell der Typ I-Allergie**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Christina Barwig

geb. Priesmeyer

geb. am 28.10.1978 in Mainz

Mainz, 28.01.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2008

A Inhaltsverzeichnis

A	Inhaltsverzeichnis	I
B	Danksagungen	VIII
C	Veröffentlichungen, Poster, Vorträge	IX

1.	Einleitung	1
1.1	Typ 1 Allergien Ursachen, Symptome und Therapiemöglichkeiten	1
1.2	Regulatorische T-Zellen (Treg)	5
1.2.1	Thymus-generierte, natürliche regulatorische CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen	5
1.2.2	Induzierte regulatorische T-Zellen und die immunmodulatorischen Zytokine IL-10 und TGFβ	8
1.2.2.1	Tr1-Zellen	8
1.2.2.2	Th3-Zellen	10
1.2.3	CD8 ⁺ Suppressor-T-Zellen	12
1.2.4	CD4 ⁻ CD8 ⁻ doppelt negative T-Zellen	14
1.2.5	NKT-Zellen	15
1.3	DC-gerichtete Strategien zur Induktion von Treg	18
1.3.1	Dendritische Zellen	18
1.3.2	Transfer von DC mittels biolistischer Transfektion	20
1.4	Ziele der Arbeit	24

2. Materialien und Methoden

2.1	Materialien	26
2.1.1	Laborgeräte	26
2.1.2	Labor- und Verbrauchsmaterialien (Glas & Plastikware)	30
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	33
2.1.4	Puffer, Lösungen und Kulturmedien	36

2.1.4.1	Puffer und Lösungen	36
2.1.4.2	Kulturmedien und Zusätze	39
2.1.4.3	Medien und Nährböden für die Bakterienkultur	41
2.1.4.4	ELISA-Puffer und –Lösungen	41
2.1.4.5	Lösungen für die Herstellung von Gen-Pistolen-Patronen	42
2.1.4.6	Fertigsysteme	43
2.1.4.7	Plasmidvektoren	43
2.1.5	Antikörper	43
2.1.5.1	FACS-Isotypkontrollantikörper	43
2.1.5.2	FACS-Primärantikörper (anti-Maus)	44
2.1.5.3	Streptavidin (SA)-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate für die FACS-Färbung	46 46
2.1.5.4	Antikörper für Zytokin-ELISA und IFN- γ -ELISpot	46
2.1.5.4.1	„Capture“-Antikörper	46
2.1.5.4.2	Detektionsantikörper	47
2.1.5.5	Antikörper für Immunglobulin-ELISA	48
2.1.5.6	MACS [®] -MicroBeads	49
2.1.6	Zytokine	49
2.1.7	Peptide	50
2.1.8	Antigene	50
2.1.9	Enzyme	51
2.1.9.1	Allgemeine Enzyme	51
2.1.9.2	Restriktionsendonukleasen	51
2.1.10	Primer	52
2.1.10.1	Primer für die Realtime-PCR	52
2.1.10.2	Primer für die konventionelle PCR	52
2.1.11	Versuchstiere	53
2.1.12	Zelllinien	53
2.1.12.1	NIH3T3	53
2.1.12.2	RBL-2H3	54
2.1.13	Bakterienstamm	55
2.2	Tierversuche und zellbiologische Methoden	55
2.2.1	DNA-Immunisierung mit der Genpistole	55

2.2.1.1	Kopplung von Plasmid-DNA an Goldpartikel und Herstellung der Patronen für die Genpistole	55
2.2.1.2	Durchführung der biolistischen Transfektion	56
2.2.2	Protein-Immunisierungsmethoden	57
2.2.2.1	Herstellung der Proteinlösungen für die Immunisierung der Versuchstiere	57
2.2.2.2	Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford	57
2.2.2.3	Proteinimmunisierung durch Injektion	58
2.2.2.3.1	Intraperitoneale Immunisierung mit KLH und OVA zur Untersuchung des Dosiseffekts	58
2.2.2.3.2	Intraperitoneale Immunisierung mit β Gal	58
2.2.2.3.3	Intraperitoneale und subkutane Immunisierung mit OVA und BSA im Asthmaversuch	59
2.2.2.3.3.1	Sensibilisierung	59
2.2.2.3.3.2	Therapeutische Injektionen	59
2.2.2.4	Intranasale (i.n.) Applikation von OVA	59
2.2.3	Transfer von Milzzellen und Milzzellpopulationen	60
2.2.4	Serumgewinnung	60
2.2.5	Nicht-invasive Messung der Atemwegsreaktivität	60
2.2.6	Zellbiologische Methoden	62
2.2.6.1	Kulturbedingungen	62
2.2.6.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	62
2.2.6.3	Präparation von lymphoiden Organen	62
2.2.6.3.1	Präparation von Lymphknotenzellen	62
2.2.6.3.2	Präparation von Milzzellen	63
2.2.6.4	Antigenspezifische Stimulation von Milz- und Lymphknotenzellen	63
2.2.6.5	Aufreinigung von Zellpopulationen aus Organzellsuspensionen mit der MACS [®] -Technologie	64
2.2.6.5.1	Positivseparation von CD90 ⁺ , CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	64
2.2.6.5.2	Negativseparation von T-Zellen	65
2.2.6.5.3	Negativselektion von B-Zellen	66
2.2.6.5.4	Aufreinigung von CD4/CD8 doppelt negativen T-Zellen (dnTZ)	66

2.2.6.6	Proliferationstest	67
2.2.6.7	Proliferations-Suppressions-Test	68
2.2.6.8	Bronchoalveoläre Spülung (BAL)	69
2.2.6.9	Anfertigung von Zytospinpräparaten	70
2.2.6.10	Differenzierung der Zellen aus der Lungenspülung	70
2.2.6.11	ELISA zur Bestimmung von Zytokinen in der BALF und in Kulturüberständen	72
2.2.6.12	ELISA zur Bestimmung antigenspezifischer Immunglobuline in Immuseren	73
2.2.6.13	RBL-Test	75
2.2.6.14	CTL-ELISpot	77
2.2.6.15	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	79
2.2.7	Grafik und Statistik	82
2.3	Molekularbiologische Methoden	82
2.3.1	Herstellung von chemokompetenten TOP10-Zellen	82
2.3.2	Herstellung von elektrokompenten TOP10-Zellen	83
2.3.3	Transformation und Kultivierung von Bakterien	83
2.3.3.1	Transformation von chemokompetenten TOP10-Zellen	84
2.3.3.2	Transformation von elektrokompenten TOP10-Zellen	84
2.3.4	Aufreinigung von Plasmid-DNA	85
2.3.4.1	Schnelle Aufreinigung von Plasmid-DNA	85
2.3.4.2	Isopropanol-Minipräparation von Plasmid-DNA	85
2.3.4.3	Aufreinigung von Plasmid-DNA mit dem Plasmid Mini Kit von Qiagen	86
2.3.4.4	Aufreinigung von endotoxinfreier Plasmid-DNA mit dem Plasmid Midi Kit von Qiagen	87
2.3.5	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	88
2.3.6	Restriktion von Plasmid-DNA	89
2.3.6.1	Restriktionskontrollen	89
2.3.6.2	Restriktion zu Klonierungszwecken	90
2.3.6.3	Dephosphorylierung zur Stabilisierung restringierter Plasmide	90
2.3.7	Aufreinigung von restringierter DNA	91

2.3.8	Agarose-Gelelektrophorese	91
2.3.9	Gel-Elution	93
2.3.10	Ligation	94
2.3.11	Auffüllen von überhängenden Restriktionsenden mittels Klenow-Behandlung	94
2.3.12	Transfektion von NIH-3T3-Zellen	94
2.3.13	RNA-Isolierung	95
2.3.14	Reverse Transkription	97
2.3.15	Konventionelle PCR	97
2.3.16	Quantitative („Realtime“) -PCR	99
3.	Ergebnisse	102
3.1	Untersuchungen zur Etablierung eines Mausmodells der spezifischen Immuntherapie (SIT) zur Analyse der Rolle regulatorischer T-Zellen	102
3.2	Untersuchungen zur Rolle regulatorischer T-Zellen bei der antigendosisabhängigen Regulation der IgE-Produktion	114
3.2.1	Antikörper-Produktion nach Immunisierung mit niedrigen und hohen Antigen-Dosen	115
3.2.2	Untersuchung der Th2/Th1-Balance nach Immunisierung mit niedrigen und hohen Antigen Dosen	119
3.2.3	Untersuchungen zur phänotypischen Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen nach Immunisierung mit niedrigen bzw. hohen Antigen Dosen	123
3.2.4	<i>In vitro</i> -Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen nach Immunisierung mit niedrigen bzw. hohen Antigen Dosen	128
3.2.5	<i>In vivo</i> -Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung von Treg nach Immunisierung mit hohen Antigen Dosen	131

3.3	Herstellung und Funktionsanalysen von IL-10 und TGFβ kodierenden Expressionsplasmiden zur Induktion von regulatorischen T-Zellen	142
3.3.1	Herstellung von IL-10- und TGF β -kodierenden Expressionsplasmiden	142
3.3.1.1	Klonierung von pCMV-TGF β 1-IRES-cOVA	143
3.3.1.2	Klonierung von pCMV-TGF β 1	146
3.3.1.3	Klonierung von pFascin	147
3.3.1.4	Klonierung von pFascin-TGF β 1-IRES-cOVA	148
3.3.1.5	Klonierung von pFascin-TGF β 1	149
3.3.1.6	Klonierung von pCMV-IL-10-IRES-cOVA	149
3.3.1.7	Klonierung von pFascin-IL-10-IRES-cOVA	151
3.3.1.8	Klonierung von pFascin-IL-10	151
3.3.2	Analysen zur Funktionalität von IL-10- und TGF β 1-Kodierenden Expressionsplasmiden	152
3.3.2.1	Nachweis von IL-10- und TGF β -mRNA durch PCR-Analysen	153
3.3.2.2	Nachweis der Zytokinproduktion durch transfizierte NIH-3T3-Zellen	155
3.3.2.3	<i>In vivo</i> -Funktionsanalysen von Expressionsplasmiden	157
3.3.3	Untersuchungen zur Induktion von regulatorischen T-Zellen im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I-Allergie durch Vakzinierung mit IL-10 oder TGF β kodierenden Plasmiden	158
4.	Diskussion	180
4.1	Aufklärung der Rolle regulatorischer T-Zellen im murinen Modell einer spezifischen Immuntherapie	180
4.2	Induktion von regulatorischen T-Zellen mittels DNA-Vakzinierung zur Modulation allergenspezifischer Immunantworten	195
5.	Zusammenfassung	202

6. Literaturverzeichnis 204

D	Anhang	X
E	Abkürzungsverzeichnis	XII
F	Lebenslauf	XIV

B Danksagung

Ich danke allen, mit denen ich während meiner Doktorarbeit zusammengearbeitet habe für die schöne Zeit. Meiner Doktormutter und meinem Betreuer gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die Unterstützung bei Fragen zur Versuchsplanung sowie das stete Interesse an den Fortschritten meiner Experimente.

Ich danke meinen Eltern dafür, dass sie mich immer in allen meinen Vorhaben unterstützt haben.

Meinem Mann danke ich für seine Unterstützung und seine Geduld, wenn ich lange Tage im Labor oder am Computer zugebracht habe.

C Veröffentlichungen

Originalpublikation

K. Gisch, N. Gehrke, M. Bros, C. Priesmeyer, J. Knop, A.B. Reske-Kunz, S. Sudowe. *Formalin-fixed Staphylococcus aureus particles prevent allergic sensitization in a murine model of type I allergy.* **International Archives of Allergy and Immunology** 2007; **144**: 183-196.

Tagungsberichte

S. Sudowe, K. Gisch, N. Gehrke, M. Bros, C. Priesmeyer, A.B. Reske-Kunz. *Inhibition of allergic sensitization and suppression of Th2-mediated airway inflammation by application of formalin-fixed Staphylococcus aureus-particles.* **37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), 05. – 08. September 2007, Heidelberg.** Kongressabstract.

S. Sudowe, C. Priesmeyer, A.B. Reske-Kunz. *Role of regulatory T cells in antigen dose-dependent regulation of murine IgE responses.* **World Immune Regulation Meeting, 11. - 15. April 2007, Davos, Schweiz.** Kongressabstract.

S. Sudowe, K. Gisch, M. Bros, C. Priesmeyer, J. Knop, A.B. Reske-Kunz. *Formalin-fixed Staphylococcus aureus particles prevent allergic sensitization in a murine model of type I allergy.* **19. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 16./17. März 2007, Mainz.** *Allergo-Journal* **16**: 41 (Abstract V29).

C. Priesmeyer, A.B. Reske-Kunz, S. Sudowe. *Influence of antigen dose on murine IgE antibody responses: dose-dependent induction of regulatory T cells?* **5th EAACI GA2LEN Davos meeting: Basic Immunology Research in Allergy and Clinical Immunology, 01. - 04. Februar 2007, Davos, Schweiz.** Kongressabstract.

C. Priesmeyer, M. Bros, A.B. Reske-Kunz, S. Sudowe. *Antigen dose-dependent regulation of murine IgE antibody responses: role of regulatory T cells.* **1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology, 06. – 09. September 2006, Paris, Frankreich.** Kongressabstract.

S. Sudowe, C. Priesmeyer, E. Montermann, J. Knop, A.B. Reske-Kunz. *Inhibition of IgE production by gene gun-mediated DNA vaccination is mediated by CD4⁺ and CD8⁺ T cells and depends on IFN- γ production.* **1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology, 06. – 09. September 2006, Paris, Frankreich.** Kongressabstract.

C. Priesmeyer, S. Hübner, E. Montermann, M. Bros, J. Knop, A.B. Reske-Kunz, S. Sudowe. *Relevance of direct priming versus cross-priming for the induction of CD8⁺ T cell responses by gene gun-mediated DNA immunization.* **4th EAACI GA2LEN Davos meeting: Basic Immunology Research in Allergy and Clinical Immunology, 16. – 19. Februar 2006, Garmisch-Partenkirchen.** Kongressabstract.

1. Einleitung

Die Zahl allergischer Erkrankungen nimmt in der heutigen Zeit stark zu. Viele Menschen leiden unter Nahrungsmittelallergien, atopischer Dermatitis oder allergischen Atemwegserkrankungen wie Heuschnupfen oder allergischem Asthma, welche auch als Zivilisationskrankheiten bekannt sind. Oft werden diese Allergien z.B. durch Feinstaubbelastung am Arbeitsplatz ausgelöst oder verschlimmert, so dass nicht selten die schweren Symptome zur Arbeitsunfähigkeit führen. Es ist daher ein wichtiges Forschungsziel, die Mechanismen der Entstehung von Allergien zu verstehen und innovative Strategien der Allergie-Prävention und -Therapie zu entwickeln und zu evaluieren.

1.1 Typ 1 Allergien Ursachen, Symptome und Therapiemöglichkeiten

Allergien lassen sich in vier verschiedene Gruppen einteilen:

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

Tabelle 1.1.1: Einteilung der Hypersensibilitätsreaktionen nach Coombs und Gell

Coombs und Gell klassifizierten 1968 vier verschiedene Typen allergischer Reaktionen anhand von Merkmalen wie dem zeitlichen Ablauf, der Art des Antigens, der an der Reaktion beteiligten Immunkomponenten und Effektormechanismen sowie den Krankheitsbildern.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit der Typ I Allergie, auch als Überempfindlichkeit vom Soforttyp bekannt. Die genetische Veranlagung zur Ausbildung einer Typ I Allergie wird Atopie genannt. Atopiker haben einen erhöhten IgE-Spiegel im Serum. Allergenspezifische IgE-Antikörper werden von einer geringen Anzahl B-Zellen produziert [Maurer et al. 1994, Geha et al. 2003]. IgE bindet an die hoch-affinen FcεRI-Rezeptoren auf Gewebemastzellen, deren Kreuzvernetzung mit dem spezifischen Antigen zu einer Ausschüttung von verschiedenen Mediatoren wie Histamin und Leukotrienen führt, welche die klinischen Symptome wie z.B. Anschwellen der Schleimhäute, gesteigerte Mukusproduktion oder Gefäßerweiterung verursachen [Geha et al. 2003]. Atopische Individuen können verschiedene Ausprägungen der Typ I Allergie wie Asthma, allergische Rhinokonjunktivitis, atopische Dermatitis, Nahrungsmittelallergien und Anaphylaxie entwickeln. Alle werden durch Th2-polarisierende Bedingungen im Organismus begünstigt. Die Typ 2 polarisierte Antwort ist charakterisiert durch die starke Entwicklung von Th2-Zellen und die Bildung der entsprechenden Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13. Die allergische Reaktion läuft in zwei Phasen ab: Während der Sensibilisierung, dem ersten Kontakt mit dem Antigen, manifestiert sich die starke Th2-Polarisierung und resultiert in einer starken antigenspezifischen IgE-Produktion. In der Auslösungs- bzw. Provokationsphase, d.h. bei späteren Kontakten mit demselben Allergen, kommt es zu den lokalen Reaktionen sowie der Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten. Charakteristische Merkmale von allergischem Asthma sind die Atemwegshyperreaktivität auf diverse spezifische und unspezifische Stimuli hin, Atemwegsentzündungen, Eosinophilie und gesteigerte Mukussekretion. Patienten mit allergischem Asthma neigen außerdem dazu, nach häufiger Stimulation eine chronische Atemwegsentzündung zu entwickeln [Umetsu und DeKruyff et al. 1997, Wills-Karp et al. 1998, Geha et al. 2003].

Eine Erklärung für die stetige Zunahme von Allergien in der modernen Welt liefert die Hygiene-Hypothese. Die initiale Hygienehypothese besagt, dass Menschen, die in der Kindheit häufig bakterielle Infektionen hatten, ein eher Th1-polarisiertes Immunsystem entwickeln und daher weniger anfällig für Th2-vermittelte Allergien sind [Strachan 1989]. Diese Sicht der Hygienehypothese wurde mittlerweile weiterentwickelt und verändert. Es wurde beobachtet, dass Menschen, die in der Kindheit oft von parasitischen Würmern (Helminthen) infiziert wurden, eine geringere Neigung zu Allergien haben. Paradoxerweise induzieren solchen Infektionen

zunächst starke Th2-Antworten und IgE-Antikörper [Yazdanbakhsh et al. 2001, Geha et al. 2003]. Neuere Studien legen nahe, dass die allergiehemmenden Effekte früher Wurminfektionen auf der Bildung von regulatorischen T-Zellen beruhen, die sowohl Th1- als auch Th2-Antworten inhibieren [Geha et al. 2003].

Es gibt diverse Studien, die zeigen, dass Schistosomeninfektionen etablierte Allergien in Menschen verbessern können [Yazdanbakhsh et al. 2001, Geha et al. 2003]. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass während einer chronischen Helmintheninfektion immunregulatorische Zytokine ausgeschüttet werden und eine regulatorische Zellpopulation entsteht, die auch vor allergischen Reaktionen schützen kann [Maizels und Yazdanbakhsh 2003]. Nähere Erkenntnisse liefern Untersuchungen, in denen die Infektion von Mäusen mit *Schistosoma mansoni* diese in einem Anaphylaxie-Modell schützt. Der protektive Effekt wird hier durch IL-10-produzierende B-Zellen vermittelt, welche während des Wurm-Stadiums induziert werden. Ein Transfer dieser regulatorischen B-Zellen kann die Protektion auch auf uninfizierte Mäuse übertragen [Mangan et al. 2004].

Die bisher einzige kausale Therapieform zur langfristigen Therapie von Typ I Allergien ist die allergenspezifische Immuntherapie (SIT), auch unter dem Namen Hyposensibilisierung bekannt.

Die konventionelle SIT zur Therapie atopischer Krankheiten wurde am St. Mary's Hospital in London entwickelt und viele der Grundprinzipien, die Freeman 1914 beschrieb, gelten noch heute. Eine SIT besteht in der wiederholten Gabe von ansteigenden Dosen des spezifischen Allergens. Dieses wird dem Patienten subkutan verabreicht. Die Mechanismen, die zu einer erfolgreichen SIT führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Allerdings kommt es bei erfolgreicher Therapie zu bestimmten immunologischen Veränderungen: Die saisonale Steigerung der allergenspezifischen IgE-Produktion wird inhibiert, während eine verstärkte Produktion von IgG4-Subklassen einsetzt, die als blockierende Antikörper fungieren. Am Entzündungsherd sind weniger Effektorzellen anzutreffen und die antigenspezifische T-Zellproliferation wird gehemmt. Außerdem wird die T-Zellbalance von Th2 nach Th1 verschoben und regulatorische T-Zellen werden induziert [Akdis und Blaser 1999, Lewis 2002, Frew 2003, Till et al. 2004]. Bellinghausen et al. beschrieben 1997 erstmals, dass die SIT mit einer gesteigerten IL-10-Produktion einhergeht. Seitdem wurde die Induktion von IL-10-produzierenden regulatorischen T-Zellen in vielen Studien beobachtet und gilt als Schlüsselereignis bei der

erfolgreichen SIT [Bellinghausen et al. 1997, Till et al. 2004, Vissers et al. 2004, Piconi et al. 2007].

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

Die SIT wird am Menschen erfolgreich bei der Therapie von bestimmten Heuschnupfenarten und der Bienengiftallergie eingesetzt. Sie ist allerdings nicht so effektiv bei der Bekämpfung von allergischem Asthma. Problematisch ist auch, dass die SIT nicht in allen Patienten effektiv ist und dass die Behandlung einen langen Zeitraum von 3-5 Jahren umfasst [Lewis 2002, Frew 2003, Till et al. 2004].

Deshalb wurde und wird stets an Möglichkeiten gearbeitet, die SIT zu vereinfachen und zu verbessern bzw. andere wirksame Therapiestrategien zu entwickeln.

Als Alternative zur SIT wurde beispielsweise die Effizienz einer anti-Zytokin-gerichteten Therapie untersucht. Coyle et al. [1995] arbeiteten mit IL-4-defizienten Mäusen und Grünig et al. [1998] depletierten selektiv IL-4 bzw. IL-13. Sie konnten allergische Symptome jedoch nur unvollständig verbessern. Auch mit einem kombinierten IL-4-/IL-13-Inhibitor konnten nur Teilerfolge erzielt werden. Dabei scheint das Hauptproblem darin zu bestehen, etablierte allergische Immunantworten abzuschalten oder in harmlose Reaktionen umzuwandeln [Grunewald et al. 1998, Hahn et al. 2003, Gogishvili 2007].

Ein neuartiges Verfahren zur Therapie von IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen basiert auf einer Anti-IgE-Antikörperbehandlung. Der humanisierte monoklonale Anti-IgE-Antikörper, der unter dem Namen Omalizumab auf den Markt kam, bindet allergen-unspezifisch vor allem frei zirkulierendes IgE, aber auch zellständiges IgE und verhindert damit dessen Bindung an die FcεRI-Rezeptoren auf Mastzellen und Basophilen und die Degranulation dieser Zellen [Busse 2001, Casale 2001, Sarinho und Cruz 2006]. Außerdem wird durch die Verminderung des freien IgEs im Serum ein Feedbackmechanismus ausgelöst, der zu einer reduzierten Expression von hoch-affinen FcεRI-Rezeptoren auf Mastzellen und Basophilen führt [Sarinho und Cruz 2006]. Der Anti-IgE-Antikörper wird den Patienten subkutan injiziert. Die Therapie mit Omalizumab führte in Testpatienten mit allergischem Asthma oder allergischer Rhinitis zu einer deutlichen Abnahme der Empfindlichkeit im Allergenprovokationstest und zu einer reduzierten Methacholinempfindlichkeit.

Außerdem war die Sputumeosinophilie reduziert. In Testpatienten mit allergischer Rhinitis waren außerdem die Reizungen von Augen und Nase signifikant vermindert. Diese Effekte korrelierten mit dem Abfall der IgE-Titer in den Seren [Busse 2001, Casale 2001, Morjaria et al. 2007]. Für Asthmatiker bietet diese Form der Therapie besondere Vorteile, da Allergisches Asthma bisher hauptsächlich mit inhalativen Kortikosteroiden behandelt wird, die bei milder oder moderater Ausprägung der Krankheit wirksam sind, zur Behandlung von schwerem Asthma jedoch häufig nicht ausreichen. In klinischen Studien wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Omalizumab auch in Patienten mit schwerem Asthma, deren Symptome nicht durch Kortikosteroide behandelbar sind, zu einer signifikanten Verminderung der Symptome führt [Busse 2001, Sarinho und Cruz 2006, Morjaria et al. 2007].

Diese allergen-unspezifische Form der Therapie ist wirksam bei allergischem Asthma und allergischer Rhinitis. Es werden weiter Studien durchgeführt, die zeigen sollen, ob Omalizumab auch bei anderen Erkrankungen wie z.B. atopischer Dermatitis oder chronischer Urticaria eingesetzt werden kann. [Sarinho und Cruz 2006, Forman und Garrett 2007, Spector et al. 2007].

1.2 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Die gezielte Induktion von regulatorischen T-Zellen (Treg) ist ein vielversprechender Ansatz zur Therapie von Allergien, aber auch anderer Immundysfunktionen wie Autoimmunkrankheiten. Die immunologische Forschung beschäftigte sich in den letzten Jahren intensiv mit der Identifizierung und Charakterisierung regulatorischer T-Zellen und mittlerweile sind viele verschiedene Zellpopulationen mit immunregulatorischen Kapazitäten bekannt.

1.2.1 Thymus-generierte, natürliche regulatorische CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

Die wohl bekanntesten und am intensivsten erforschten regulatorischen T-Zellen sind die von Sakaguchi erstmals 1995 beschriebenen natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (nTreg). nTreg umfassen in Mäusen und Menschen 5-10% der peripheren CD4⁺ T-Zellen. Frisch isolierte nTreg exprimieren konstitutiv CD25 und intrazelluläres CTLA-4 [Jonuleit et al. 2001, Sakaguchi 2004].

Aktiviert nTreg sind hypoproliferativ und supprimieren benachbarte Effektor-T-Zellen *in vitro*. Die Aktivierung der nTreg über den T-Zellrezeptor (TCR) ist antigenspezifisch, die Suppression ist jedoch antigenunspezifisch und zell-zell-kontaktabhängig [Thornton und Shevach 1998, Jonuleit et al. 2001, Sakaguchi 2004]. nTreg entwickeln sich im Mäusethymus etwa drei Tage nach der Geburt und ihre Erhaltung/Langzeitfunktion hängt wahrscheinlich von der Erkennung von Autoantigenen in der Peripherie ab [Jonuleit et al. 2001, Sakaguchi 2004]. Für ihre Homöostase ist außerdem die Stimulation über CD28- und CD154-Korezeptoren durch professionelle APC notwendig. Deren Liganden CD80/86 und CD40 werden in der Peripherie nur von Dendritischen Zellen (DC) exprimiert. So kontrollieren DC die periphere Toleranz [Jonuleit et al. 2001].

Ein gesundes Immunsystem zeichnet sich durch die Balance zwischen $CD4^+CD25^-$ T-Helferzellen und $CD4^+CD25^+$ nTreg aus. Eine Störung dieses Gleichgewichts führt zu schwerer Immunpathologie. $CD4^+CD25^+$ nTreg tragen zum Erhalt der peripheren Toleranz bei und schützen vor Autoimmunkrankheiten, indem sie Immunantworten auf Autoantigene supprimieren. Auch Immunreaktionen auf Alloantigene können inhibiert werden und somit Überempfindlichkeitsreaktionen auf harmlose Umweltantigene verhindert werden [Sakaguchi et al. 1995, Maloy und Powrie 2001, Sakaguchi 2004].

Im Mausmodell führt die Depletion von $CD4^+CD25^+$ Treg zu Autoimmunkrankheiten und Multiorganinflammationen in den Tieren. Es kommt aber auch zu effektiver Tumormunität und gesteigerten Immunantworten gegen pathogene und kommensale Bakterien. In Menschen führt eine Mutation im FOXP3-Gen (kodiert den Transkriptionsfaktor Scurfin) dazu, dass keine funktionellen nTreg gebildet werden. Dies hat verheerende Auswirkungen auf das Immunsystem, die sich in einer Erkrankung mit dem Namen IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked) manifestieren. Dabei kommt es zu Multiorganinflammation, schweren Autoimmunkrankheiten wie Typ 1 Diabetes, chronischen Entzündungen des Intestinaltraktes und diversen Allergien wie allergischer Dermatitis und Lebensmittelallergien [Gambineri et al. 2003].

$CD4^+CD25^+$ Treg in der Maus exprimieren Foxp3, das murine Ortholog zum humanen FOXP3. Eine transgene Expression von Foxp3 in konventionellen $CD4^+$ T-Zellen kann diese zu funktionell aktiven $CD4^+CD25^+$ Treg konvertieren [Hori et al. 2003, Fontenot et al. 2003]. Foxp3-defiziente Mäuse (Scurfy-Mäuse)

können keine funktionellen nTreg entwickeln und leiden an IPEX-ähnlichen Krankheiten [Brunkow et al. 2001, Wildin et al. 2001, Fontenot et al. 2003]. Foxp3 scheint also das absolute Kontrollgen für die Entwicklung und Funktion von nTreg zu sein. In der Maus ist Foxp3 außerdem bisher der beste molekulare Marker zur Identifizierung dieser Zellen [Hori et al. 2003, Fontenot et al. 2003].

Neben dem Transkriptionsfaktor Foxp3 spielen bestimmte Oberflächenmoleküle eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Funktion von nTreg. nTreg exprimieren konstitutiv die IL-2-Rezeptor- α -Kette (CD25), einen Teil des hoch-affinen IL-2-Rezeptors. Dieser ist nicht nur ein wichtiges Identifizierungsmerkmal, sondern spielt außerdem eine essentielle Rolle bei der Entwicklung und Funktion dieser Zellen. Mäuse mit einer angeborenen oder temporär ausgelösten Defizienz für IL-2, CD25 oder CD122 (IL-2-Rezeptor- β -Kette) entwickeln ein ähnliches Krankheitsbild wie Foxp3-defiziente Scurfy-Mäuse [Willerford et al. 1995, Malek et al. 2002, Setoguchi et al. 2005].

Ein weiteres charakteristisches Molekül ist das GITR (glucocorticoid-induced TNFR family related gene/protein). CD4⁺CD25⁺ nTreg exprimieren größere Mengen GITR auf ihrer Zelloberfläche als andere T-Zellen oder B-Zellen. Injiziert man neugeborenen Mäusen monoklonale Antikörper gegen GITR entwickeln sie ähnliche Autoimmunkrankheiten wie nach Depletion der CD4⁺CD25⁺ Treg [Shimizu et al. 2002].

Des Weiteren exprimieren nTreg konstitutiv CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4), einen inhibitorischen Rezeptor, der die T-Zell-Aktivierung hemmt. CTLA-4 konkurriert mit dem aktivierenden Kostimulator CD28 um die Bindung von CD80 und CD86. Damit kann CTLA-4 durch das Blockieren dieser Moleküle gleichzeitig das positive Aktivierungssignal verhindern und selbst ein inhibitorisches Signal senden. Die Bindungsaffinität von CTLA-4 zu CD80/86 ist viel höher als die von CD28, so dass bereits eine geringe Expression des inhibitorischen Rezeptors zu einer starken Hemmung führen kann. Während CD28 von T-Zellen konstitutiv exprimiert wird, wird die Expression von CTLA-4 erst nach der Aktivierung über den TCR induziert [Salomon und Bluestone 2001, Salto und Yamasaki 2003]. CTLA-4-defiziente Mäuse entwickeln ein lymphoproliferatives Krankheitsbild und sterben nach wenigen Wochen, und die Behandlung von normalen Mäusen mit monoklonalen Antikörpern gegen CTLA-4 führt zur Entwicklung von autoimmuner Gastritis und Kolitis. Des Weiteren bricht die Blockierung von CTLA-4 die suppressive Aktivität von Treg *in vitro*

[Waterhouse et al. 1995, Read et al. 2000]. CTLA-4 ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz *in vivo*. Allerdings ist die Rolle von CTLA-4 bei der Treg-vermittelten Suppression unklar [Chai et al. 2002, Kataoka et al. 2005].

1.2.2 Induzierte regulatorische T-Zellen und die immunmodulatorischen Zytokine IL-10 und TGF β

Neben den nTreg, die einen zell-zell-kontaktabhängigen Suppressionsmechanismus nutzen, gibt es auch induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg) die über IL-10- oder TGF- β -vermittelte Suppressormechanismen agieren [Groux et al. 1997, Annacker et al. 2001, Satoguina et al. 2005, Zhao et al. 2006]. Diese werden beispielsweise induziert, wenn DC in der Peripherie Autoantigene von apoptotischen Zellen ohne inflammatorischen Stimulus aufnehmen und präsentieren. Bei der Präsentation dieser Autoantigene in den regionalen Lymphknoten entstehen regulatorische T-Zellen, keine Effektor-T-Zellen [Jonuleit et al. 2001, Sakaguchi 2004]. Außerdem können DC durch die Kultur mit immunmodulatorischen Faktoren wie TGF β oder IL-10 tolerogenisiert werden. Solche DC können Immunantworten z.B. durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen regulieren [Steinbrink et al. 1997, Strobl und Knapp 1999].

1.2.2.1 Tr1-Zellen

Tr1-Zellen sind induzierte CD4⁺ regulatorische T-Zellen in Maus und Mensch, die ihre Zielzellen durch die Sekretion des immunregulatorischen Zytokins IL-10 supprimieren [Gregori et al. 2007].

Tr1-Zellen lassen sich *in vitro* durch die Stimulation mit IL-10, die Behandlung mit Vitamin D3 oder dem Kortikosteroid Dexamethason (Dex) oder die Blockierung von IL-4 und IL-12 mit monoklonalen Antikörpern induzieren [Groux et al. 1997, Barrat et al. 2002]. Levings et al. [2001] induzierten Tr1-Zellen *in vitro* durch die Stimulation von naiven humanen CD4⁺ T-Zellen in einer APC-losen Kultur über ihren TCR in Anwesenheit von IL-10. Sie demonstrierten, dass die zusätzliche Stimulation mit IFN- α , nicht aber mit TGF β einen synergistischen Effekt mit IL-10 auf die Tr1-Induktion hat [Levings et al. 2001]. *In vivo* konnten u.a. durch die repetitive

Stimulation mit Influenza Hämagglutinin oder mit Superantigen IL-10-produzierende Tr1-Zellen induziert werden [Buer et al. 1998, Sundtstedt et al. 1997, Miller et al. 1999].

Tr1-Zellen sind bei der Kontrolle verschiedener Autoimmunkrankheiten von Bedeutung. Sie schützen z.B. Mäuse vor Kolitis [Akdis und Blaser 1999]. Die initiale IL-10-Produktion von spezifischen T-Zellen induziert deren Anergie und inhibiert Entzündungsreaktionen durch die Inaktivierung von Mastzellen sowie basophilen und eosinophilen Granulozyten [Akdis und Blaser 1999].

In einem Mausmodell für „inflammatory bowel disease“ (IBD) konnten Groux et al. [1997] die Induktion der Krankheit durch den Kotransfer von Tr1-Zellen mit den pathogenen $CD4^+CD45RB^{high}$ T-Zellen verhindern. Die antigenspezifische Aktivierung der Tr1-Zellen über ihren TCR *in vivo* war für die Ausübung ihrer regulatorischen Funktion essentiell [Groux et al. 1997]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass IL-10-produzierende Tr1-Zellen bei der Regulation der experimentellen allergischen Encephalomyelitis (EAE) eine wichtige Rolle spielen. Im Laufe der EAE nimmt die Anzahl an regulatorischen Tr1-Zellen zu, während die Anzahl der Effektor-T-Zellen abnimmt [Wildbaum et al. 2002].

Verschiedene Studien belegen, dass bestimmte Tumorarten Prostaglandin E_2 (PGE_2) produzieren und damit die Differenzierung von Tr1-Zellen fördern und ein immunsuppressives Mikromilieu um das Tumorgewebe schaffen [Akasaki et al. 2004, Bergmann et al. 2007]. Auch bestimmte Krankheitserreger nutzen die Induktion von Tr1-Zellen, um der Immunabwehr zu entgehen [Rouse und Suavas et al. 2007, Oderda et al. 2007]. In einer Patientenstudie mit Kindern wurde nachgewiesen, dass eine chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* mit einer erhöhten IL-10-Produktion in der Magenschleimhaut in Zusammenhang steht. Die immunologischen Veränderungen, die mit einer solchen chronischen *H. pylori*-Infektion einhergehen, schützen außerdem vor Allergien [Oderda et al. 2007].

Auch bei der Transplantattoleranz spielen Tr1-Zellen eine Rolle. In Transplantationsmodellen mit allogenen Stammzelltransplantaten wurden IL-10-produzierende allospezifische Tr1-Zellen nachgewiesen [Bacchetta et al. 1994].

Wie bereits erwähnt, supprimieren Tr1-Zellen ihre Zielzellen durch die Sekretion des immunmodulatorischen Zytokins IL-10. Ursprünglich wurde IL-10 als Th2-Zytokin definiert, welches die Th1-Antwort hemmt. IL-10 ist jedoch ein genereller Inhibitor der Proliferation und Zytokinproduktion von Th1- und Th2-Zellen *in vitro* und *in vivo*

[Akdis und Blaser 1999, Fiorentino et al. 1991]. IL-10 wird außer von Tr1-Zellen auch von Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und NK-Zellen sezerniert [De Waal Malefyt et al. 1991, O'Garra et al. 1992, Vieira et al. 1991, Mosmann und Coffman 1989, Groux et al. 1997, Akdis und Blaser 1999]. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, mittels IL-10 Immunantworten zu modulieren: IL-10 inhibiert die Aktivierung von T-Zellen, indem es in die Kostimulation eingreift und den CD28-Signalweg inhibiert. IL-10 bindet an seinen Rezeptor und blockiert dadurch die Tyrosin-Phosphorylierung von CD28 und die Assoziation von CD28 mit der p85PI-3-Kinase. IL-10 agiert auch auf der Ebene der Zytokinen-Transkription und inhibiert die mRNA-Akkumulation [Akdis und Blaser 1999].

Allerdings fördert IL-10 das Wachstum aktivierter CD8⁺ T-Zellen [Groux et al. 1998]. In Bezug auf die Kontrolle von Typ I Allergien ist dieser Effekt von IL-10 besonders interessant, da CD8⁺ T-Zellen in Ratten die IgE-Produktion hemmen können [Kemeny und Diaz-Sanchez 1991].

IL-10 steht jedoch auch in engem Zusammenhang mit Th2-polarisierten Immunantworten. Es wird von Th2-Zellen produziert und steigert Th2-Antworten. Daher wird die Rolle von IL-10 in Th2-vermittelten Krankheiten wie allergischem Asthma kontrovers diskutiert [Moore et al. 2001].

In einigen Publikationen wird beschrieben, dass Tr1-Zellen neben IL-10 auch TGFβ produzieren [Akasaki et al. 2004, Groux et al. 1997, Battaglia et al. 2006].

1.2.2.2 Th3-Zellen

Th3-Zellen sind TGFβ-sezernierende CD4⁺ T-Zellen mit suppressiven Effekten auf Th1-Zellen und andere Immunzellen. Außerdem fördern Th3-Zellen die IgA-Produktion [Weiner 2001]. Die *in vitro*-Stimulation von Th0-Vorläuferzellen mit TGFβ resultiert in der Differenzierung von Th3-Zellen. Die Zugabe von IL-10 oder anti-IL-12 wirkt synergistisch mit TGFβ auf die Th3-Induktion [Seder et al. 1998]. Th3-Zellen werden über ihre Zytokinproduktion als eigenständiger T-Zelltyp charakterisiert. Sie sezernieren TGFβ, jedoch kein IL-2, IL-4, IL-10 oder IFN-γ [Inobe et al. 1998].

Das immunregulatorische Molekül TGFβ ist ein hochkonserviertes Polypeptid mit einer Masse von 25 kDa, das in homodimerer Form sezerniert wird [Lawrence 2001] und hauptsächlich immunsuppressive Wirkungen hat. TGFβ hemmt das Wachstum

von hämatopoetischen Zellen und B-Zellen sowie die IL-2-Produktion und Proliferation von T-Zellen [Lingnau et al. 1998, Hoehn et al. 1995, Schmitt et al. 1994]. An Keratinozyten und Epithelzellen wurde gezeigt, dass die Induktion von p15^{Ink4b}, einem Zellzyklus-Inhibitor, für den antiproliferativen Effekt von TGFβ verantwortlich ist. P15^{Ink4b} hemmt CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) und CDK6, welche den Zellzyklus kontrollieren. Ihre Hemmung führt zu einem Wachstumsstopp in der G1-Phase [Feng et al. 2000]. Es ist jedoch nicht bekannt, ob ein vergleichbarer Mechanismus auch für die antiproliferative Wirkung von TGFβ auf T-Zellen zutrifft.

Außerdem hemmt TGFβ die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen sowohl in Th1- als auch in Th2-Richtung [Lund et al. 2003, Mosmann und Sad 1996, Gorelik et al. 2002]. TGFβ greift in die Th2-Entwicklung ein, indem es die Produktion des IL-4-Rezeptors hemmt und damit den IL-4/Stat6-Signalweg stört und die GATA-3-Expression inhibiert [Heath et al. 2000]. Die Hemmung der Th1-Differenzierung erfolgt über die Inhibition der T-bet-Expression auf mRNA-Ebene [Gorelik et al. 2002] und ist bei der oralen Toleranzinduktion und als potentielle Therapie bei Th1-dominierten Autoimmunantworten von Bedeutung [Neurath et al. 1995, Stuber et al. 1996].

TGFβ-sezernierende Th3-Zellen haben u.a. eine regulatorische Funktion bei der Induktion von oraler Toleranz im EAE-Modell in Mäusen und Ratten [Weiner 2001]. Die Darmmukosa hat ein Mikromilieu, das bereits im Ruhezustand reich an den Zytokinen IL-4, IL-10 und TGFβ ist. Die Sekretion dieser Zytokine steigt nach oraler Antigengabe stark an [Abbas et al. 1996]. Dieses Zytokinmilieu fördert die Bildung von Th2- und Th3-Zellen im Darm. Weiner [2001] beschreibt zwei dosisabhängige Mechanismen bei der Induktion von oraler Toleranz: niedrige Antigen Dosen induzieren IL-4- und IL-10-sezernierende Th2-Zellen sowie TGFβ-sezernierende Th3-Zellen, welche ein regulatorisches Umfeld schaffen und Th1-Antworten supprimieren. Bei der oralen Applikation von hohen Antigen Dosen kommt es hingegen zur Deletion oder Anergisierung von Th1- und Th2-Zellen [Weiner 2001].

Auch in anderen Bereichen der Toleranzinduktion spielen Th3-Zellen eine wichtige Rolle. Josien et al. [1998] zeigten, dass TGFβ-sezernierende Th3-Zellen die Toleranz für Allotransplantate vermitteln können. Seddon und Mason et al. [1999] wiesen Th3-Zellen in einem Rattenmodell für autoimmune Thyroiditis nach. Außerdem zeigte die

Gentherapie mit TGF β -transgenen MBP-spezifischen T-Zellen im EAE-Modell Erfolge [Chen et al. 1998].

Im Menschen ist bekannt, dass die antigenspezifische „Hyporesponsiveness“ von Immunzellen bei einer chronischen Helmintheninfektion auf die regulatorischen Effekte von TGF β -sezernierenden Th3-Zellen und IL-10-sezernierenden Tr1-Zellen zurückzuführen ist [Doetze et al. 2000]. Außerdem wurde im Menschen ein selbst-MHC-restringierter T-Zelltyp nachgewiesen, dessen Zytokinprofil auf einen gemischten Th3/Tr1-Phänotyp hinweist [Kitani et al. 2000].

1.2.3 CD8⁺ Suppressor-T-Zellen

CD8⁺CD28⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL) produzieren IFN- γ , TNF- α und Lymphotoxine. Die CTL-Antwort richtet sich gegen Viren und intrazelluläre Pathogene. Daneben gibt es CD8⁺CD28⁻ Suppressor-T-Zellen, die etablierte Immunantworten abschalten können oder die Toleranz gegenüber bestimmten Antigenen aufrechterhalten. Dazu ist die Interaktion von CD8⁺ mit CD4⁺ T-Zellen nötig [Vukmanovic-Stejic et al. 2001].

CD8⁺ Suppressor-T-Zellen spielen in vielen Bereichen eine Rolle: Suppression der Antikörperantwort auf lösliche und zellassoziierte Antigene und der Antwort gegen Superantigene, Suppression von Autoimmunerkrankungen, Inhibition von Transplantationskomplikationen wie „graft-versus-host disease“ (GVHD) und Transplantatabstoßung sowie von virusinduziertem Asthma [Vukmanovic-Stejic et al. 2001, Chitnis et al. 2001, Sun et al. 1988, Zhang et al. 1993, Douillard et al. 1996]. TGF β -produzierende CD8⁺ Suppressor-T-Zellen vermitteln die Induktion von oraler Toleranz im EAE-Modell [Chen et al. 1994, Chen et al. 1995]. Manche CD8⁺ Subpopulationen produzieren immunregulatorische Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF β [Vukmanovic-Stejic et al. 2001].

Es existieren zwei Hypothesen, wie CD8⁺ Suppressor-T-Zellen ihre Zielzellen erkennen:

1. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erkennen gleichzeitig bestimmte Peptid-MHC-Komplexe auf der antigenpräsentierenden Zelle (APC). Die aktivierte CD8⁺ Suppressor-T-Zelle supprimiert oder inaktiviert die CD4⁺ T-Zellen in ihrer Nähe mittels sezernierter Produkte oder Zell-Zell-Kontakt oder sie tolerogenisiert die APC bzw. tötet diese ab.

2. CD8⁺ T-Zellen erkennen die aktivierten CD4⁺ T-Zellen direkt und antigen-spezifisch. Aktivierte CD8⁺ Suppressor-T-Zellen können diese CD4⁺ T-Zellen dann abtöten oder inaktivieren.

Als Effektormechanismen zum Abtöten der Zielzellen kommen direkte Lyse oder Apoptoseinduktion in Frage. Als Mediatoren sind Fas/Fas-Ligand oder Perforin sowie TNF- α wahrscheinlich. Weiterhin kann die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen mittels inhibitorischer Zytokine direkt oder durch die Modifikation der APC indirekt supprimiert werden [Vukmanovic-Stejic et al. 2001].

Einen Mechanismus der indirekten Suppression kann man sich so vorstellen, dass CD8⁺CD28⁻ T-Zellen das kostimulatorische Potenzial der APC (Expression von CD80/CD86 auf der APC) inhibieren oder den CD40-Signalweg durch Interferenz mit dem CD40-Liganden auf der T-Zelle unterbrechen und somit die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen verhindern, welche dadurch nicht in der Lage sind, IL-2 zu produzieren und in Anergie verfallen [Vukmanovic-Stejic et al. 2001]. Außerdem wurde gezeigt, dass CD8⁺ Suppressor-T-Zellen die Expression inhibitorischer Rezeptoren wie ILT3 und ILT4 auf Monozyten und DC induzieren und die APC tolerogenisieren können, so dass diese wiederum CD4⁺ T-Helferzellen anergisieren [Chang et al. 2002].

Ergebnisse einer Studie im Ratten-Allergiemodell legten nahe, dass CD8⁺ Suppressor-T-Zellen die IgE-Produktion inhibierten, indem sie B-Zellen oder APC abtöteten. Außerdem könnte die Produktion von IFN- γ dazu beitragen, dass die IgE-Produktion durch die B-Zellen oder die Differenzierung von CD4⁺ Th2-Zellen inhibiert wird [Vukmanovic-Stejic et al. 2001]. Eine wichtige Bedeutung CD8⁺ Suppressor-T-Zellen bei der Regulation normaler Immunantworten zeigen Experimente von Colovai et al. [2001]: Die wiederholte Stimulation mit allogenen PBMC induzierte proliferierende CD8⁺CD28⁺ T-Zellen und nicht proliferierende CD8⁺CD28⁻ T-Zellen. Isolierte nicht proliferierende CD8⁺CD28⁻ T-Zellen konnten durch wiederholte Stimulation mit APC und IL-2 zur Expansion gebracht werden. CD8⁺CD28⁻ Suppressor-T-Zellen regulieren Immunantworten herunter. Zunächst existiert die Population nur in einer sehr geringen Größe. Nach wiederholter Stimulation nimmt der Anteil CD8⁺CD28⁻ Suppressor-T-Zellen jedoch zu, was zu einer Inhibition der Immunantwort führt. Diese Form der antigen-induzierten „Nonresponsiveness“ ist ein wichtiger Regulationsmechanismus zur Kontrolle von Immunantworten. Wenn nach der ersten Immunantwort noch Antigenreste vorhanden

sind, führt die wiederholte Stimulation zur Expansion der CD8⁺CD28⁻ Suppressor-T-Zellen, welche die APC-Funktion inhibieren, so dass es zu keiner weiteren Aktivierung von Effektorzellen kommt [Colovai et al. 2001].

Die Generierung CD8⁺ Suppressor-T-Zellen erfolgte in verschiedenen Studien z.B. durch die Stimulation von naiven T-Zellen mit plasmazytoiden DC [Gilliet und Liu 2002] oder immaturren DC [Chang et al. 2002] oder durch die Stimulation mit allogenen Zellen unter Zugabe von IL-2 und TGFβ *in vitro* [Zheng et al. 2004]. Noble et al. [2006] generierten durch wiederholte Stimulation von MHC-I-restringierten CD8⁺ T-Zellen mit IL-10, Vitamin D3 und Dex oder anti-IL-4 und anti-IL-12 *in vitro* regulatorische IL-10-sezernierende T-Zellen, welche ihre Zielzellen in zell-zell-kontaktabhängiger Weise supprimierten [Noble et al. 2006]. Durch die Injektion von haptenträgenden apoptotischen Zellen wurden CD8⁺ Suppressor-T-Zellen induziert, die AICD (anterior chamber-associated immune deviation) mittels TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)-Expression induzierten. Solche TRAIL-exprimierenden CD8⁺ Suppressor-T-Zellen entstehen auch bei der Aktivierung von CTL ohne die Kostimulation von CD4⁺ T-Helferzellen [Griffith et al. 2007]. Die Stimulation mit allogenen PBMC führt zur Induktion von CD8⁺CD28⁻ Suppressor-T-Zellen *in vivo* [Liu et al. 2001, Colovai et al. 2001].

1.2.4 CD4⁻CD8⁻ doppelt negative T-Zellen

Neben den verschiedenen bekannteren CD4⁺ oder CD8⁺ Treg-Populationen gibt es eine CD4⁻CD8⁻ doppelt negative T-Zellpopulation mit immunregulatorischen Eigenschaften (dnTZ). Diese wurde bereits vor fast 30 Jahren beschrieben, es gibt jedoch nur wenige Studien, die sich mit dnTZ befassen. Es gibt im peripheren Blut von gesunden Menschen eine CD3⁺CD4⁻CD8⁻αβ-TCR⁺ T-Zellpopulation, die einen maturaen Status aufweist und sich mit IL-3 stimulieren lässt. DnTZ exprimieren CD2, CD3, den IL-2-Rezeptor und den αβ-TCR. Sie sind negativ für CD4, CD8, CD28, sowie die δ-TCR-Kette. Die Aktivierung über den TCR kann lytische Aktivität induzieren. Sie proliferieren stark nach Stimulation mit IL-2, IL-4 und IL-3. Die Stimulierbarkeit mit IL-3 ist ein einzigartiges Charakteristikum der dnTZ [Londei et al. 1989]. Zhang et al. haben diese Zellen bei Transplantationsexperimenten auch in Mäusen und Ratten beschrieben [Zhang et al. 2000, Zhang et al. 2006]. Im Allo-

Hauttransplantationsmodell konnten sie dnTZ nachweisen, die CD8⁺ Effektor-T-Zellen derselben TCR-Spezifität inhibierten. In *ex vivo*-Experimenten wurde gezeigt, dass dnTZ allospezifische CD8⁺ T-Zellen über Fas-FasL-Interaktion eliminieren. Die Rückführung von *ex vivo* aktivierten Rezipienten-dnTZ verlängerte die Transplantatakzeptanz *in vivo* signifikant. Die dnTZ wurden als αβ-TCR⁺, CD4⁻, CD8⁻, CD25⁺, CD28⁻, CD30⁺ und CD44⁻ identifiziert [Zhang et al. 2000].

In einem Xeno-Transplantationsmodell mit Herztransplantaten aus Lewis-Ratten-Donoren für C57BL/6-Maus-Rezipienten konnten Zhang et al. zeigen, dass eine Kombination aus Immunsuppressiva und aktivierten dnTZ die Transplantatakzeptanz signifikant verlängerte [Zhang et al. 2006].

1.2.5 NKT-Zellen

NKT-Zellen gehören per Definition zu den T-Zellen, da sie einen TCR exprimieren. Dies unterscheidet sie von den NK-Zellen, mit denen sie jedoch auch charakteristische Merkmale wie die Expression von CD161 (murines CD161c = NK1.1) teilen. Abweichend von konventionellen T-Zellen oder regulatorischen T-Zellen erkennen NKT-Zellen keine MHC-Peptid-Komplexe, sondern CD1d-präsentierte Glykolipidantigene. CD1d ist ein nicht-klassisches antigenpräsentierendes Molekül und die CD1d-Erkennung ist für die Selektion von NKT-Zellen im Thymus wichtig [Godfrey und Kronenberg 2004, Bendelac et al. 1995]. CD1d-defiziente Mäuse besitzen keine NKT-Zellen [Mendiratta et al. 1997]. CD1 wird auf verschiedenen Zelltypen exprimiert inklusive Zellen myeloiden und lymphoiden Ursprungs. CD1 präsentiert vor allem hydrophobe Lipidantigene und Glykolipidantigene, weniger die klassischen Peptidstrukturen [Brigl et al. 2004]. Zu den bekannten Glykolipidantigenen gehören mykobakterielle Zellwandbestandteile, synthetische α- und β-Galaktosylceramide sowie autologe Antigene, wie Ganglioside und Phospholipide [Godfrey und Kronenberg 2004]. Durch die Erkennung von CD1d-präsentierten Nicht-Peptid-Antigenen spielen NKT-Zellen eine wichtige Rolle beim Schutz des murinen Organismus vor bakteriellen, viralen und parasitären Erkrankungen [Brigl et al. 2003, Godfrey und Kronenberg 2004].

Klassische NKT-Zellen sind auch als invariante NKT-Zellen (iNKT) oder Typ I NKT-Zellen bekannt. Zur Erkennung nicht-polymorpher Liganden exprimieren iNKT eine

invariante α -Kette (Maus: Va14-Ja18, Mensch: Va24-Ja18) zusammen mit einer begrenzten Auswahl an β -Ketten. NKT-Zellen sind in der Evolution so hoch konserviert, dass Maus-NKT-Zellen auch CD1-Moleküle aus dem Menschen erkennen und umgekehrt. Es gibt jedoch spezies-spezifische Unterschiede in der Frequenz und Verteilung von NKT-Zellen, z.B. machen sie ca. 10 - 40% der Lymphozyten in der murinen Leber aus, jedoch weniger als 1% der humanen Leberlymphozyten. Die Bedeutung dieser Unterschiede ist unklar [Godfrey und Kronenberg 2004].

NKT-Zellen haben den Phänotyp aktivierter Zellen oder Gedächtniszellen [Godfrey und Kronenberg 2004]. Nach der Aktivierung über ihren TCR sezernieren iNKT große Mengen diverser Zytokine, wie IL-4 und IL-13 (Th2-Zytokine) oder IFN- γ und TNF (Th1-Zytokine) und können Reifungssignale an benachbarte Zellen, wie DC, NK-Zellen, B-Zellen und T-Zellen (Beeinflussung sowohl in Th1- als auch in Th2-Richtung möglich) aussenden [Vincent et al. 2002, Galli et al. 2003, Godfrey und Kronenberg 2004]. Manche NKT-Zellen haben einen Th0-ähnlichen Phänotyp und sezernieren gleichzeitig Th1- und Th2-Zytokine [Godfrey und Kronenberg 2004].

NKT-Zellen greifen in verschiedenen Systemen auf unterschiedliche Weise immunregulatorisch ein: mal durch die Produktion von Th2-Zytokinen oder IL-10, in anderen Fällen durch die Produktion von Th1-Zytokinen. Auch zell-zell-kontaktabhängige Mechanismen sind bekannt. Es gibt zahlreiche Beispiele für die immunregulatorische Bedeutung von NKT-Zellen. So ist beispielsweise die Toleranz in der vorderen Augenkammer (ACAID = anterior chamber-associated immune deviation) abhängig von NKT-Zellen und deren IL-10-Produktion. Dabei induzieren NKT-Zellen CD8⁺ Treg (evtl. direkt durch IL-10), die für eine antigenspezifische Toleranz im ACAID-Modell verantwortlich sind. Proteinunspezifische NKT-Zellen können so indirekt einen proteinspezifischen Suppressionsmechanismus bewirken. Außerdem können NKT-Zellen Transplantattoleranz in verschiedenen Mausmodellen vermitteln (allogene Cornea- und Herztransplantate, xenogenes Ratten-Pankreastransplantat) und GVHD supprimieren [Godfrey und Kronenberg 2004].

Auch in verschiedenen autoimmunen Systemen haben NKT-Zellen immunregulatorische Effekte. Beispielsweise ließen sich iNKT-Defekte in vielen Studien mit dem Auftreten autoimmuner Typ I Diabetes in Verbindung bringen. In NOD-Mäusen sind NKT-Zellen in Anzahl und Funktion geschwächt [Baxter et al. 1997,

Godfrey und Kronenberg 2004]. NOD-Mäuse können jedoch durch diverse NKT-Zell-Modulationen vor Diabetes geschützt werden. Dazu zählen die Erhöhung der iNKT-Anzahl mittels Transgenese oder Zelltransfer und die Stimulation der NKT-Zellen mit dem exogenen Liganden α -Galaktosylceramid [Lehuen et al. 1998, Hammond et al. 1998, Sharif et al. 2001, Godfrey und Kronenberg 2004]. Es wurde weiterhin gezeigt, dass NKT-Zellen die Differenzierung von pankreasinselzellspezifischen CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Effektorzellen inhibieren. Diese Inhibition wird nicht durch Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13 oder TGF β vermittelt. Stattdessen scheint ein zell-zell-kontaktabhängiger Mechanismus involviert zu sein [Novak et al. 2005]. Außerdem induzieren NKT-Zellen wahrscheinlich durch Modulation der APC Anergie in β -inselzellspezifischen Effektor-T-Zellen [Godfrey und Kronenberg 2004].

Des Weiteren wurde in einem Mausmodell für chronische Kolitis mit Hilfe von Transferexperimenten gezeigt, dass NKT-Zellen Kolitis reduzieren können. In einem präventiven Ansatz konnte durch den Transfer von DX5⁺ NKT-Zellen die Kolitisentstehung verhindert werden [Hornung et al. 2006]. Außerdem konnten DX5⁺ NKT-Zellen eine bereits etablierte Kolitis reduzieren. Diese Effekte waren abhängig von CD1d und PD-L1. *In vitro* wurde gezeigt, dass NKT-Zellen in kolitisinduzierenden T-Zellen über PD-1-PD-L1-Ligation programmierten Zelltod auslösen [Hornung et al. 2006].

NKT-Zellen haben nicht nur tolerogenisierende Effekte, sie können in bestimmten Systemen auch immunstimulatorisch wirken. Dies geschieht beispielsweise bei der Anti-Tumor-Antwort. Es gibt Studien, die belegen, dass NKT-Zellen wichtig bei der IL-12-vermittelten Tumorthherapie in Mäusen sind. NKT-abhängige Tumorabstoßungsreaktionen wurden bei Melanomen, Thymomen, Karzinomen und Sarkomen gefunden. Der NKT-abhängige Schutz vor Tumorerkrankungen scheint IFN- γ -abhängig zu sein, da bestimmte Anti-Tumor-Mediatoren wie TNF, Fas-Ligand und Perforin von NKT-Zellen IFN- γ -abhängig exprimiert werden. Außerdem fördern NKT-Zellen durch die Produktion von IFN- γ und IL-12 die NK-Aktivität und beeinflussen APC zur Induktion CTL, welche ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Anti-Tumor-Immunität spielen [Godfrey und Kronenberg 2004].

Auch in murinen allergischen und inflammatorischen Systemen scheinen NKT-Zellen eher eine immunstimulatorische Rolle bei der Sensibilisierung und Pathogenese zu spielen. Im Modell der allergischen Atemwegsentzündung scheinen NKT-Zellen

durch die Produktion von IL-4 und IL-13 die Sensibilisierung zu fördern [Godfrey und Kronenberg 2004]. Auch im Kontakthypersensitivitätsmodell wurde gezeigt, dass IL-4-produzierende NKT-Zellen eine wichtige Rolle dabei spielen, Effektorzellen zum Entzündungsherd zu rekrutieren [Godfrey und Kronenberg 2004]. Es wird allerdings noch darüber diskutiert, ob auch im Humansystem ein Zusammenhang zwischen NKT-Zellen und Atopie besteht [Godfrey und Kronenberg 2004].

1.3 DC-gerichtete Strategien zur Induktion von Treg

1.3.1 Dendritische Zellen

Neben der Hyposensibilisierung, die eine allergische Immunantwort über nicht vollständig geklärte Art und Weise in eine nicht-allergische, eher Th1-gerichtete Immunantwort umwandelt und auch zur Induktion von regulatorischen T-Zellen führt, gibt es neuere Therapieansätze, die eine direkte und gezielte Modulation der Hauptregulatoren des Immunsystems, der Dendritischen Zellen (DC), zum Ziel haben.

DC sind hochdifferenzierte antigenpräsentierende Zellen, die eine Schlüsselrolle bei der Initiierung und Regulation der T-Zell-Immunität spielen. Während eine gute Antwort auf Pathogene und Tumoren gewährleistet sein muss, verhindern DC aber auch die Reaktion gegen Autoantigene und harmlose Umwelt-Antigene. Verschiedene Stimuli wie über „toll like“-Rezeptoren (TLR) erkannte Pathogene, CD40-Ligand, Hitzeschockproteine und inflammatorische Zytokine können die DC-Reifung stimulieren und so die T-Zell-Immunität auslösen [Bancherau et al. 2000].

DC kommt eine Schlüsselrolle bei der Induktion von Immunantworten zu, da nur sie als sogenannte „professionelle“ APC naive T-Zellen effizient aktivieren können. DC-Vorläufer aus dem Knochenmark werden zu zirkulierenden Vorläuferzellen, die in periphere Gewebe wandern (Haut, Lunge, Intestinaltrakt) und dort zu unreifen DC (iDC) werden. Immature DC zeichnen sich durch Phagozytoseaktivität aus, exprimieren jedoch kaum kostimulatorische Moleküle auf der Zelloberfläche. Nehmen iDC Pathogene auf, bekommen sie einen Reifungsstimulus und maturieren, während sie in die sekundären lymphoiden Organe auswandern. Sie prozessieren die aufgenommenen Antigene und präsentieren sie als MHC-Peptid-Komplexe auf der

Zelloberfläche. Außerdem wird die verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle induziert. Reife aktivierte DC (mDC) verlieren ihre Phagozytoseaktivität, sind aber nun zur Antigenpräsentation und Aktivierung von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen fähig. Aktivierte CD4⁺ T-Helferzellen regulieren nun wiederum die Differenzierung von Effektorzellen wie CD8⁺ cytotoxische T Lymphozyten und Plasmazellen [Banchereau und Steinman 1998, Bancherau et al. 2000].

In Abwesenheit von inflammatorischen Stimuli können immature ruhende DC Toleranz induzieren. Die regulatorischen Effekte können durch Zugabe immunmodulatorischer Faktoren wie TGFβ oder IL-10 verstärkt werden [Steinbrink et al. 1997, Strobl und Knapp 1999]. DC in den peripheren Organen haben normalerweise einen immaturen Phänotyp. Auch einige DC in den Lymphknoten sind immatur. Wahrscheinlich kommen naive T-Zellen in den Lymphknoten mit solchen immaturen DC in Kontakt, die Autoantigene präsentieren und werden von ihnen tolerogenisiert, was zum Erhalt der Selbst-Toleranz und zur Verhinderung von Autoimmunität führt. Nur infolge eines inflammatorischen Stimulus sind DC in der Lage, Effektor-T-Zellen zu induzieren. Es wurde beobachtet, dass Autoimmunkrankheiten meistens nach einer Infektion zum ersten Mal auftreten. Wahrscheinlich ist dies eine Nebenreaktion der Endzündungsreaktion, bei der immature DC, die Autoantigene aufgenommen haben durch das inflammatorische Umfeld am Infektionsherd einen Reifungsstimulus bekommen, maturieren und autoreaktive naive T-Zellen aktivieren [Jonuleit et al. 2001].

Verschiedene Studien nutzen IL-10, um DC in einem immaturen bzw. semi-maturen Zustand zu halten und sogenannte tolerogene DC zu induzieren [Steinbrink et al. 1997, Strobl und Knapp 1999, Jonuleit et al. 2001, Bellinghausen et al. 2006]. Eine Therapie-Möglichkeit für Patienten mit Autoimmunkrankheiten oder Allergien könnte die Generierung von humanen DC aus peripheren Vorläuferzellen, ihre Modifikation mit IL-10 und Rückführung in den Organismus sein. Die Behandlung von murinen Langerhanszellen mit IL-10 führt zum Beispiel zu einer Inhibition von Th1-Antworten. Die Modulation von DC mit IL-10 kann ein wichtiger Mechanismus zur Limitierung immunpathologischer oder autoreaktiver T-Zell-Antworten sein. Die Modulation von DC ist aber auch ein häufiger „Escape-Mechanismus“: Tumoren geben oft IL-10 ab, was zu einer Inhibition der Anti-Tumor-Immunität führt [Jonuleit et al. 2001].

Da DC eine zentrale Rolle im Immunsystem einnehmen, ist die Evaluierung und Etablierung von Techniken, um allergenspezifische Treg durch die Modifikation von

DC *ex vivo* oder *in vivo* zu generieren ein wichtiges Forschungsziel. Eine gezielte Induktion spezifischer Treg bietet vielversprechende Möglichkeiten zur Therapie diverser Allergien und Autoimmunkrankheiten.

1.3.2 Transfer von DC mittels biolistischer Transfektion

Die biolistische Transfektion ist eine effektive Methode, um humorale und zelluläre Immunantworten gegen plasmidkodierte Antigene zu induzieren [Tang et al. 1992]. Dazu wird antigenkodierende Plasmid-DNA nicht-kovalent an mikroskopisch kleine Goldpartikel gekoppelt. Mit diesen DNA-beladenen Partikeln werden spezielle Patronen hergestellt, die in eine Genpistole geladen werden. Diese beschleunigt das Gold mithilfe von Heliumdruck in die Epidermis und Dermis, wo die DNA-Goldpartikel direkt in die Hautzellen eindringen und diese transfizieren. Hauptsächlich werden dabei Keratinozyten transfiziert [Condon et al. 1996, Porgador et al. 1998]. Transfizierte Keratinozyten und dermale DC oder Langerhanszellen können ein Transgen unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promoters (z.B. CMV) exprimieren. Eine Immunantwort auf ein pCMV-kontrolliertes Antigen setzt sich deshalb aus den Effekten direkt transfizierter DC und dem Einfluss der sogenannten Kreuzpräsentation zusammen. Als Kreuzpräsentation bezeichnet man Mechanismen, die dazu führen, dass exogene Antigene von APC, v.a. von DC, über die eigentlich der Präsentation von endogenen Antigenen vorbehaltenen MHC I-Moleküle präsentiert werden. DC können exogene Antigene mittels Phagozytose (große partikuläre Antigene), rezeptorvermittelter Endozytose (kleine partikuläre Antigene) und Pinozytose bzw. Makropinozytose (lösliche Antigene) aus der benachbarten extrazellulären Flüssigkeit aufnehmen. Es gibt verschiedene Theorien, wie diese internalisierten exogenen Antigene in den MHC Klasse I-Weg eingeschleust werden können. Eine Theorie geht davon aus, dass durch Phagozytose oder Endozytose aufgenommene Antigene im Phagolysosom nur unvollständig degradiert werden. Intakte Antigene können ins Zytosol freigesetzt werden und von dort aus in den konventionellen MHC Klasse I-Weg gelangen [Reis e Sousa und Germain 1995]. Eine weitere Möglichkeit zur Kreuzpräsentation bietet die Fusion des Phagosoms mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER), wobei das entstehende Phagosom-ER-Kompartiment MHC I-Moleküle und alle für deren Beladung notwendigen Moleküle

enthält [Cresswell et al. 1999]. Zusätzlich kann es noch zum Austausch von Peptiden auf MHC I-Molekülen kommen. Dies kann geschehen, wenn Peptide aus den endolysosomalen Kompartimenten wieder in die extrazelluläre Flüssigkeit abgegeben werden. Diese Peptide können dann an benachbarte MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche binden, wobei sie leere Bindungsstellen besetzen oder aber gebundene Peptide verdrängen können [Grommé et al. 1999]. Zu einem solchen Peptidaustausch kann es auch kommen, wenn MHC I-Moleküle von der Zelloberfläche in ein peptidhaltiges Kompartiment internalisiert werden.

Wenn man sich ausschließlich die Immunantwort ansehen möchte, die von direkt transfizierten DC ausgeht, muss man daher einen DC-spezifischen Promoter wählen. Ross et al. stellten in mehreren Veröffentlichungen den Fascin-Promoter als geeigneten DC-spezifischen Promoter vor.

Fascin ist ein Strukturprotein zur Vernetzung von Aktinfilamenten und ist somit essentiell für die Ausbildung der Dendriten reifer Dendritischer Zellen. Fascin wird von reifenden Langerhanszellen exprimiert [Ross et al. 1998, Ross et al. 2000]. Für die Wahl des Fascin-Promoters zum transkriptionellen „Targeting“ von DC in der Haut sprechen folgende Argumente [Ross et al. 1998, Ross et al. 2000, Ross et al. 2003, Jaffe et al. 1998]:

- 1) Ein Strukturprotein wie Fascin wird in der Zelle in großen Mengen benötigt. Es ist also eine hohe Transkriptionsrate der nachgeschalteten Gene zu erwarten.
- 2) Die Fascin-Synthese wird bei der Ausreifung muriner und humaner DC eingeschaltet. Fascin wird nur in ausreifenden und maturen DC exprimiert.
- 3) Die Expression von Fascin ist außer in DC nur in neuronalen Geweben, Kapillar-Endothelzellen und folliculären DC möglich.

Von den in Punkt 3 genannten Zelltypen sind bei der biolistischen Transfektion nur dermale DC und Langerhanszellen für die Transkription über den Fascin-Promoter relevant, er eignet sich also, um die Transgenexpression auf DC der Haut zu beschränken.

Zum Nachweis der DC-spezifischen Expression von durch den Fascin-Promoter kontrollierten Genen und der Funktionalität des Promoters *in vitro* und *in vivo* wurde zunächst EGFP unter der Kontrolle des 2,6 kb großen Fascin-Promoters in einen Plasmidvektor kloniert (pFascin). *In vitro* wurde nachgewiesen, dass das pFascin-EGFP-Konstrukt nur in der maturen murinen DC-Linie DC2.4 abgelesen wird, jedoch nicht in der immaturren XS52-DC-Zelllinie. *In vivo* wurden nach biolistischer

Transfektion Hautpräparate und Lymphknotenzellen auf EGFP-Expression untersucht. Nur Langerhanszellen exprimierten EGFP. In den DNA-immunisierten Mäusen konnten außerdem eine EGFP-spezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort sowie EGFP-spezifische IgG-Antikörper in den Seren nachgewiesen werden [Ross et al. 2003]. Weiterführende Transfektionsstudien im Mausmodell wurden von Sudowe et al. und Ludwig-Portugall et al. in den letzten vier Jahren veröffentlicht. Die Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit dem Gen für das Modellallergen β -Galaktosidase (β Gal) unter der Kontrolle des Fascin-Promoters (pFascin- β Gal) induzierte eine starke Th1-Antwort einhergehend mit einer starken IFN- γ -Produktion durch T-Helferzellen in der Milz und den Lymphknoten sowie einer vorherrschenden Produktion von IgG2a. Die vergleichende Immunisierung mit dem Gen für das Modellallergen β Gal unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promoters (pCMV- β Gal) führte zwar in der Milz auch zu einer Th1-Zytokinproduktion, aber in den Lymphknoten zu einer gemischten Sekretion von Th1- und Th2-Zytokinen. Außerdem induzierte die Immunisierung mit pCMV- β Gal eine starke IgG1-Produktion. Mit beiden Konstrukten ließen sich gute CTL-Antworten induzieren [Sudowe et al. 2003]. Ludwig-Portugall et al. [2004] zeigten außerdem, dass eine prophylaktische Vakzinierung mit pCMV- β Gal oder pFascin- β Gal die IgE- und IgG1-Produktion in darauffolgend mit β Gal-Protein sensibilisierten Tieren inhibierte. Zusätzlich wurde die Bildung von IgG2a-Antikörpern gesteigert. Eine Analyse des Zytokingehalts in Milz- und Lymphknotenzellkulturüberständen zeigte außerdem eine Verschiebung von einer Th2- zu einer gemischten Th1/Th2-Antwort in den vakzinierten Mäusen. Zudem kam es durch die DNA-Immunisierung zu einer starken Induktion IFN- γ -produzierender CD8⁺ T-Zellen [Ludwig-Portugall et al. 2004]. In einem therapeutischen Ansatz demonstrierten Sudowe et al., dass die Immunisierung mit pCMV- β Gal oder pFascin- β Gal auch in bereits mit β Gal-Protein sensibilisierten Mäusen eine weitere Steigerung IgE-Antwort verhindert. Dieser Effekt war jedoch nur transient [Sudowe et al. 2006]. Die DNA-Immunisierung mit pCMV- β Gal oder pFascin- β Gal kann also die Steigerung der IgE-Produktion in Mäusen sowohl prophylaktisch als auch in gewissem Maße therapeutisch inhibieren.

Die Immunisierung mit pFascin- β Gal inhibiert zwar systemische und lokale Th2-Immunantworten effizient, induziert gleichzeitig jedoch starke Th1- und CTL-Antworten, die lokal immunpathologische Effekte haben können. So berichten Zindler et al. [2007], dass die DNA-Vakzinierung mit pFascin- β Gal zwar die

Eosinophilie in nachfolgend sensibilisierten und intranasal provozierten Mäusen reduziert, allerdings kommt es im Gegenzug zu einer starken Neutrophilie und zu einer gesteigerten AHR. Daher ist es wünschenswert, das etablierte DNA-Vakzinierungssystem so zu modifizieren, dass sowohl Th2- als auch Th1-Immunantworten auf das Modellallergen inhibiert werden oder ein tolerogenes Umfeld entsteht und regulatorische T-Zellen induziert werden.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, im Mausmodell der Typ I Allergie die Effizienz verschiedener Therapiemodelle zu prüfen, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Generierung von regulatorischen T-Zellen und die Charakterisierung der Rolle von Treg bei der Kontrolle von Typ I Allergien gelegt wurde.

Dazu wurden Versuche durchgeführt, die sich an zwei Mausmodellen für die Hyposensibilisierung (SIT) orientierten: einem Modell für die spezifische Asthmatherapie mit Langzeiteffekt nach Vissers et al. [2004] und einem Hyposensibilisierungsmodell von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Kölsch in Münster.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit diente der Aufbau eines Mausmodells für die SIT mit Langzeiteffekt von Vissers et al. [2004] als Grundlage, um eine antigenspezifische Asthmatherapie im Mausmodell zu etablieren. Der Versuchsaufbau beinhaltete eine Sensibilisierungsphase, eine Therapiephase, eine Ruhezeit und eine lokale Provokation der Versuchsmäuse mit dem Modellallergen. Als Abwandlung von der klassischen SIT, bei der den Patienten ansteigende Dosen des Allergens über einen langen Zeitraum verabreicht werden, bekamen die Versuchstiere in diesem Therapiemodell lediglich drei Injektion der höchsten Allergendosis. Ziel der Experimente war es, mit dieser schnellen spezifischen Immuntherapie die Th2-polarisierte Immunantwort zu inhibieren, Asthmasymptome wie Lungeneosinophilie und die AHR zu reduzieren und evtl. regulatorische T-Zellen zu induzieren. Spezielle Kontrollen sollten mitgeführt werden, um zu gewährleisten, dass etwaige Effekte auf eine antigenspezifische Therapie zurückgehen und keine allergenunspezifische Reaktion sind.

Dem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit lag ein Hyposensibilisierungsmodell der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Kölsch in Münster zugrunde.

Wie unter 1.1 beschrieben führt die SIT durch die wiederholte Injektion steigender Allergendosen zu Veränderungen der Immunantwort und zu einer Verbesserung der allergischen Symptome. Tatsächlich scheint die Immunisierungsdosis die Qualität einer antigenspezifischen Immunantwort in vielerlei Hinsicht zu beeinflussen. Zum Beispiel wird die Antigendosis als möglicher Differenzierungsparameter für Th1- und Th2-Zellen diskutiert. Verschiedene Studien legen nahe, dass geringe Protein-Antigendosen zu einer Ausbildung von Th2-Zellen führen, einhergehend mit starker Sekretion von Th2-Zytokinen wie IL-4 und IL-5 und der Induktion der IgE-Produktion, während hohe Antigendosen eher die Entwicklung von Th1-Zellen zu fördern scheinen [Pfeiffer et al. 1995, Guery et al. 1996, Wang et al. 1996, Sakai et al. 1999]. Außerdem gibt es diverse Studien, die zeigen, dass die zur Immunisierung verwendete Antigendosis die Intensität der IgE-Antwort bestimmt [Levine und Vaz 1970, Kolbe et al. 1991, Kolbe et al. 1994].

Kolbe et al. [1991, 1994] führten Immunisierungsversuche im Mausmodell durch, in denen sie die Immunantwort von CBA/J-Mäusen auf verschiedene Antigene/Allergene (KLH und PLA₂) und auf verschiedene Immunisierungsdosen untersuchten. Die IgE-Titer in den Seren von mit KLH immunisierten Mäusen sanken mit steigender Antigendosis, während sich die IgG2a-Produktion genau umgekehrt verhielt. Auch die IgG1-Titer stiegen mit zunehmender Antigendosis. Die inverse Regulation von IgE und IgG2a im KLH-System lässt eine Verschiebung des Th2/Th1-Verhältnisses vermuten. Allerdings scheint ein Th1-Effekt eine ungenügende Erklärung für das Phänomen zu sein. Arps et al. [1998] konnten durch Untersuchungen des Zytokinprofils in Milzzellkulturüberständen zeigen, dass sowohl in niedrigdosig als auch in hochdosig immunisierten CBA/J-Mäusen eher eine Th2-gerichtete Immunantwort stattfindet. Während die Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 in beiden Gruppen von in vitro restimulierten Milzzellen antigenspezifisch sezerniert wurden, kam es in keiner Gruppe zu einer antigenspezifischen Produktion der Th1-Zytokine IFN- γ oder IL-12. Auch intrazelluläre FACS-Analyse von kultivierten CD4⁺ T-Zellen zeigte eine starke antigenspezifische Produktion von IL-4, IL-5 und IL-10, jedoch kaum IFN- γ -Produktion. Arps et al. spekulierten, dass CD8⁺ regulatorische T-Zellen für die antigendosisabhängige IgE-Regulation verantwortlich sein könnten [Arps et al. 1998].

Die Mechanismen oder verantwortlichen Zellpopulationen, die zum Phänomen der antigendosisabhängigen IgE-Regulation in Mäusen führen, sollten in der

vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Da ein Th1-Effekt in diesem Zusammenhang ausgeschlossen worden war, wurde in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf den Nachweis regulatorischer T-Zellen in diesem System gelegt. Mittels verschiedener *in vitro* Tests wie Proliferationstests, FACS- und Realtime-PCR-Analysen sowie ELISA und mit Hilfe von Transferversuchen sollte die Zellpopulation, die die antigendosisabhängige IgE-Produktion reguliert, charakterisiert und identifiziert werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurde an einer Strategie gearbeitet, die unter 1.3.2 beschriebene DNA-Immunisierung mit der Genpistole zu verbessern. Sudowe et al. [2003, 2006] und Ludwig-Portugall et al. [2004] hatten erste DNA-Vakzinierungsversuche unter Verwendung des Expressionsplasmids pFascin-βGal durchgeführt. Die Immunisierung mit pFascin-βGal hatte Teilerfolge in der Allergie- und Asthmaprävention und -Therapie, wie die reduzierte Produktion von Th2-Zytokinen und IgE sowie die Inhibition der Lungeneosinophilie erzielt. Eine starke Th1-Antwort und Neutrophileninduktion waren jedoch weniger wünschenswerte Effekte. Zudem konnte die AHR nicht inhibiert werden. In dieser Arbeit wurde an einer Verbesserungsstrategie gearbeitet, die verschiedene Kombinationsvakzine aus einem allergenkodierenden Plasmid und Plasmiden, die für die regulatorischen Zytokine IL-10 und TGFβ kodieren, beinhaltete. Mit diesen Modifikationen sollten sowohl Th2- als auch Th1-Immunantworten auf das Modellallergen inhibiert werden oder ein tolerogenes Umfeld geschaffen und regulatorische T-Zellen induziert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller/Vertreiber
Analysenwaage	Precisa 120 A	Oerlikon AG, Zürich, Schweiz
Autoklav	V-150	Systec GmbH, Wettenberg
Bestrahlungsgerät	Gammacell 2000	Mølsgaard Medical, Risø, Dänemark
Brutschrank	CB 150	Binder GmbH, Tuttlingen
	Heraeus B 5061 EK-CO ₂	Heraeus, Hanau
	Heraeus KB 600	Heraeus, Hanau
Digitalwaage	Basic Typ 1202	Sortorius, Göttingen
Dispenser	Multipette [®] 4780	Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer	FACScan	BD, Heidelberg
Elektrophoresekammer	Horizon [™] 11.14 Horizontal Gel Electrophoresis System	Gibco BRL, Eggenstein
ELISpot-Auswerteeinheit	ELISpot Lesesystem AID	AID (Autoimmun Diagnostika GmbH), Strassberg
ELISA-Washer	Ultrawash plus	Dynex, Chantilly, USA
Folien-Einschweiß-Gerät	Heat Sealer 1295-012	Audion Elektro, Kleve
Gel-Auswertungs-System	E.A.S.Y enhanced analysis system	Herolab GmbH, Wiesloch

Gerät	Modell	Hersteller/Vertreiber
Gen-Pistolen-System	Helios™ Gene Gun, Modell 297BR0078: Cartridge-Kit (Nr. 165-2440), Präparierstation (Nr.165-2418), Schneidegerät für Patronen (Nr.165-2422)	BioRad, München
iCycler IQ®	Thermal Cycler	Bio-Rad, München
Kamera	Fotoapparat SC 35, Typ12	Olympus, Hamburg
	BX-FLA Mikroskopkamera	
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph, Kelheim
Mehrkanalpipette	Finnpipette, 12-Kanalpipette 50-300 µl	Labsystems, Helsinki, Finnland
	m 300, 12-Kanalpipette, 30 – 300 µl	Biohit, Helsinki, Finnland
Mikroskope	Labormikroskop CH-2 (4-40x)	Olympus, Hamburg
	Inverses Routinemikroskop CK-2 (4-20x)	Olympus, Hamburg
	Systemmikroskop BX50 Mit Power supply unit U RFL-T und Floureszenzfiltern	Olympus, Hamburg
Mikrowelle	EM-120S	Sanyo, San Diego, USA
pH-Meter	PH 538 MultiCal®	Wissenschaftlich- Technische Werkstätten (WTW) GmbH, Weilheim

Gerät	Modell	Hersteller/Vertreiber
Pipetten	Eppendorf-Reference®- Pipetten: 1-10 µl, 10-100 µl, 200- 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Finnpipette Digital 0,5 – 10 µl, 40 – 200 µl	Labsystems, Helsinki, Finnland
Pipettierhilfe	pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
	Pipetboy	Tecnomara, Zürich, Schweiz
Plethysmograph	Modell PLY 3211 (whole body)	Buxco Electronics, Inc. Wilmington, USA
Präparierbesteck		Hammacher, Solingen
Schüttelinkubator	RBI-112 Benchtop Incubator Shaker 'Áerotron'	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Spannungsgerät	Electrophoresis constant power supply ECPS 3000/150	Pharmacia Biotech, Freiburg
Spektralphotometer	Ultrospec 1100 pro	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
	E _{max} precision micro plate reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Sterilwerkbank	Heraeus Lamin Air® HB 2448	Heraeus, Hanau
Stickstofftank	BT 40	Láir liquid, Wiesbaden
Szintillationszähler	1205 Betaplate	LKB Wallac, Freiburg
Thermocycler	DNA Thermocycler 480	PerkinElmer, Zaventem, Belgien
	7900 HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA

Gerät	Modell	Hersteller/Vertreiber
Trocken- und Wärmeofen	T6030	Heraeus Instruments, Hanau
Ultraschallbad	Transsonic T570	Elma, Singen
UV-Tisch	N90 MW 312 NB	Faust, Schaffhausen, Schweiz
Vortexer	Vortex Genie 2, G560E	Scientific Industries Inc., New York, USA
	MELB 1719	Merck, Darmstadt
Wasserbad	GFL Typ 1012	Gesellschaft für Labortechnik mbH (GFL), Burgwedel
Wasserdeionisierungsanlage	Purelab Classic DI	ELGA, Bucks, Großbritannien
Zählhilfe	Laboratory Counter	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
	Laboratory Counter	Clay Adams, Becton Dickinson, Heidelberg
Zählkammer	Neubauer Improved Bright Line; 0,1mm	AO; Buffalo, USA
Zellerntegerät	1205-001 Cell Harvester	LKB Wallac, Freiburg
Zentrifugen	Multifuge 1 L-R (300 g = 1.200 rpm)	Heraeus, Hanau
	Sorvall RT 6000D	Sorvall, Langenselbold
	Sorvall RC 5C	DuPont, Bad Homburg
	Biofuge primo (für 1,6 und 2,5 mL Reaktionsgefäße)	Heraeus, Hanau
Zytospin-Zentrifuge	Cytospin 3	Shandon, Frankfurt

2.1.2 Labor- und Verbrauchsmaterialien (Glas & Plastikware)

Material	Größe / Bezeichnung	Hersteller
Abdeckfolie für Realtime-PCR-Platten	-	Abgene, England
Bakteriologische Petrischalen	Ø 94mm, Höhe 16mm (no 633161)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Braunüle	1,3 x 45 mm, Vasofix® (Plastikkatheter für BAL)	B/Braun, Melsungen
Deckgläser	Ø 18 mm	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
	18 x 18 mm	Vertrieb durch Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
	24 x 50 mm	Menzel Gläser GmbH & Co. KG, Braunschweig
Einmal- Feindosierungsspritze, zweiteilig	Injekt-F 1 ml 0,01 ml / 1,0 ml (für BAL)	B/Braun, Melsungen
	Omnifix®-F 1ml 0,01 ml / 1,0 ml (für i.p. Injektion)	B/Braun, Melsungen
Einmalkanülen	0,4 x 12 mm Sterican® (für i.p. Injektion)	B/Braun, Melsungen
	0,5 x 12 mm Sterican® (für i.p. Injektion)	B/Braun, Melsungen
Einmalspritzen	10 mL, Discardit™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einschweißfolien	102 x 258 mm	Wallac, Turku, Finnland
ELISA-Platten	96-Loch-Flachbodenplatte, Microlon, high binding	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
ELISpot-Platten	MultiScreen 96- Vertiefungenplatte	Millipore Corporation, USA
Eppendorfreaktionsgefäße	0,5ml, 1,5ml und 2ml	Eppendorf, Hamburg

Material	Größe / Bezeichnung	Hersteller
FACS-Röhrchen	Falcon 5 ml- Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Färbekasten und Färbegestell	für zehn Objektträger 76 x 26 mm	Roth, Karlsruhe
Faltenfilter	185 mm	Schleicher & Schuell, Dassel
Filtermembran	–	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Glasfaserfilter	102 x 258 mm	Wallac, Turku, Finnland
Glaspipetten	Pericolor 5, 10 und 25 ml	Hilgenberg GmbH, Malsfeld
	Techcolor 5, 10 und 25 ml	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
	Silberbrand Eterna 5, 10 und 25 ml	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Handschuhe	Sempercare®	Semperit, Österreich
Küvetten	Einmal-Küvetten, 1,5 ml	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Kulturflaschen	25 cm ² -Kulturflasche	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
	75 cm ² -Kulturflasche	
Kulturplatten (steril)	Costar 24-Loch Platte (F-Boden)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
	Costar 48-Loch Platte (F-Boden)	
	Cellstar 96-Loch Platte (Flachboden)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
	96 well Cell Culture Cluster, Half-Area (A/2)	Costar, Cambridge, USA

Material	Bezeichnung	Hersteller
MACS [®] Separationssäulen	MS-Säulen	Miltenyi-Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
	LS-Säulen	
Objektträger	76 x 26 cm mit Mattrand	Vertrieb durch Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
Pasteurpipetten	150 mm	VWR GmbH, Darmstadt
PCR-Platten	Thermo-Fast [®] 96, 0,2ml	Abgene, Hamburg
Pipettenspitzen	gelbe Spitzen: bis 200 µl	Sarstedt AG, Nürnbrecht
	blaue Spitzen: bis 1000 µl	Roth, Karlsruhe
Plastikpetrischalen	6 cm (no 628161)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Plastikpipetten (steril)	2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Polypropylen-Röhrchen	15 ml und 50 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Präzisions Dispenser-Tips	0,5 ml (10µl Einheiten) und 2,5 ml (50 µl Einheiten)	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt AG, Nürnbrecht
Röntgenfähiger i.v.- Katheter	6715-A01 4535-18, 186 x 51 mm (2“)	Venisystems [™] Abbocath RT, Sligo, Irland
Schlauch für Gen-Pistolen- Patronen	Tefzel Tubing	Bio Rad, München
Sterilfilter	0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
	0,2 µm	Sarstedt AG, Nürnbrecht
Thermo-96-Loch-Platten	96-Loch-Mikrotestplatte, Thermowell [®] GOLD	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellsieb	Cell Strainer: Ø 40 µm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
2-β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
2,2,2 Tribromoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-Methyl-2-butanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), Tabletten	Sigma, Deisenhofen
³ H-Thymidin (³ HTdR)	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
A23187	Sigma, Deisenhofen
Agarose, NEEO, Typ II	Sigma, Deisenhofen
Albumin, Hühnerei (Ovalbumin)	Calbiochem, La Jolla, USA
Alkopharm 70 (70%iger Alkohol) Haut und Händedesinfektion	Brüggemann, Heilbronn
Aluminiumhydroxid, Imjekt [®] Alum	Perbio, Wien, Österreich
Ampicillin (C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ S)	Ratiopharm, Ulm
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Riedel-de-Haën, Seelze
β-Galaktosidase (# G-3153)	Sigma, Deisenhofen
β-Galaktosidase	Roche
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Cölbe
Bromphenolblau, Na-Salz (C ₁₉ H ₃₇ BrNa)	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Diethylether (C ₄ H ₁₀ O)	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Diff-Quick Färbeset	Diff Quick [®] Medion Diagnostics GmbH, Düdingen, Schweiz
Dimethylformamid (DMF)	Sigma, Deisenhofen
DNase I	Roche, Mannheim
D(+)-Saccharose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Roth, Karlsruhe
Entellan [®] (zum Eindecken)	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure 100%ig (C ₂ H ₄ O ₂)	Roth, Karlsruhe

Substanz	Hersteller
Ethanol 96 %ig (C ₂ H ₅ OH)	Martin und Werner Mundo OHG, Mainz-Kostheim
Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridiumbromid) 1 % (w/v) Lösung	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ x Na ₂ x 2 H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Glukose	Sigma, St. Louis
Glycin	Roth, Karlsruhe
Gold-Trägerpartikel (1,6 µm)	BioRad, München
Harnstoff (CH ₄ N ₂ O ₃)	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Gibco BRL, Erlangen
HEPES	Roth, Karlsruhe
Interleukin-2	Cetus, Emeryville, USA
Isopropanol (2-Propanol) (C ₃ H ₈ O)	Heidinger, Stuttgart
Kaliumacetat	
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Kollagenase Typ 2	Worthington, St. Katharinen
L(+)-Glutamin (C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃), 200 mM	Roth, Karlsruhe
Glycerin	
Glycerol	
L-Tryptophan (C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂)	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
MnCl ₂	Merck, Darmstadt
Molekulargewichtsmarker (GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder Plus, 0,5 mg DNA/ml, 250-10000 Bp)	Fermentas, St. Leon-Rot
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natrium-Acetat (CH ₂ H ₃ ONa x 3H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe

Substanz	Hersteller
Natriumcitrat ($C_6H_5Na_3O_7$)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($NaH_2PO_4 \times 2 H_2O$)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid ($NaOH$)	Roth, Karlsruhe
Ortho-Phenylendiamin-Dihydrochloride (OPD), ($C_6H_8N_2 \times 2 HCL$)	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin / Streptomycin (10000 Units)	PAA, Pasching, Österreich
PMA	Sigma, Deisenhofen
pNAG	Sigma, Deisenhofen
Polyvinylpyrrolidon-Ethanol-Lösung (PVP)	BioRad, München
$RbCl_2$	Sigma, Deisenhofen
RNase-freie DNase (1500 U)	Qiagen, Hilden
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden
Roti®-Quant	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl), 37 %ig	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H_2SO_4), 95 Vol.%ig	Roth, Karlsruhe
Spermidin	Sigma, Deisenhofen
Streptavidin-Peroxidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
SYBR Green 490 Q-PCR Mastermix	Abgene, Hamburg
Szintillationsflüssigkeit	Perkin Elmer, Turku, Finnland
Tri-Natriumcitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$)	Roth, Karlsruhe
Tris ($C_4H_{11}NO_3$)	Roth, Karlsruhe
Tris/HCl ($C_4H_{11}NO_3HCl$)	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100 (Octylphenoxypolyethoxyethanol, $C_{34}H_{62}O_{11}$)	Sigma, Deisenhofen
Trypton	

Substanz	Hersteller
Tween [®] -20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Wasser, pyrogenfrei, steril	Aqua B. Braun, Melsungen
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30 %ig	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.4 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Zur Herstellung von Lösungen und Puffern wurde Wasser aus der hauseigenen Deionisierungsanlage (ELGA, Bucks, Großbritannien) verwendet. Sämtliche Puffer, Lösungen und Kulturmedien wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.

2.1.4.1 Puffer und Lösungen

AEC-Lösung

Eine AEC-Tablette wurde in 2,5 ml DMF gelöst. Von dieser Stammlösung wurden 525 µl in 10 ml 0,1 M Na-Acetatpuffer (pH 5) durch 30-minütiges Rühren auf einem Magnetrührer gelöst. Die Gebrauchslösung wurde durch einen 0,45 µm Filter filtriert und kurz vor der Färbereaktion mit 1 µl H₂O₂ / ml AEC-Lösung versetzt.

Avertin-Stammlösung

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

Avertin-Gebrauchslösung (zur Sedierung der Versuchsmäuse)

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

Bromphenolblaulösung (Puffer zum Auftragen von DNA auf Elektrophoresegele)

42 g Harnstoff (CH₄N₂O₃), 50 g D(+)-Saccharose (C₁₂H₂₂O₁₁), 0,0037 g Na₂EDTA und 0,1 g Bromphenolblau wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst.

FACS-Fixierlösung (0,7% PFA)

0,7 g Paraformaldehyd (PFA) wurden bei 56 °C in 100 ml 1 x PBS (pH 7,2) gelöst.

FACS-Medium

FCS (PAN Biotech) wurde durch einen Filter der Porengröße 0,45 µm filtriert, damit kleine FCS-Partikel nicht die Kapillaren des FACS-Gerätes verstopfen. Anschließend wurde es 2% (v/v) in 1 x PBS verdünnt. Das FCS wirkt wie eine Schutzummantelung für die Zellen und verringert deren Adhärenz am Röhrchenboden.

Gey'scher Lysepuffer

0,25 g KHCO₃, 2,07 g NH₄Cl und 0,0093 g EDTA wurden in 250 ml deionisiertem Wasser aufgelöst, auf pH 7,5 eingestellt und durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert.

Glycerinlösung zum Einfrieren von Bakterien

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

HBSS (Hank' s balanced salt solution)

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

MACS-Puffer 1 für die Aufreinigung von CD90⁺ TZ

FCS (PAN) wurde durch einen Filter mit der Porengröße 0,45 µm filtriert, um ein Verstopfen der MACS-Säulen zu vermeiden und 2% (v/v) in 1 x PBS verdünnt.

MACS-Puffer 2 für die Aufreinigung von CD11c⁺ DC

FCS (PAN) wurde durch einen Filter mit der Porengröße 0,45 µm filtriert und 0,5% (v/v) in 1 x PBS verdünnt.

MACS-Puffer 3 für die Aufreinigung von BZ, PAN TZ, CD4⁺ TZ und CD8⁺ TZ

FCS (PAN) wurde durch einen Filter mit der Porengröße 0,45 µm filtriert und 2% (v/v) in 1 x PBS / 2mM EDTA verdünnt.

1 x PBS (Phosphate buffered saline)

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

10 x PBS

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

RF1-Salzpuffer

In deionisiertem Wasser wurde ein Salzpuffer aus 100 mM RbCl_2 , 50 mM MnCl_2 , 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl_2 und 15% Glycerol angesetzt. 10%ige Essigsäure wurde 1:8 in deionisiertem Wasser verdünnt, so dass eine 0,2 Molare Säure entstand. Mit dieser wurde der pH-Wert auf 5,8 eingestellt. Der Salzpuffer wurde in 30 ml-Aliquoten bei -20°C gelagert.

RF2-Salzpuffer

In deionisiertem Wasser wurde ein Salzpuffer aus 10 mM MOPS, 10 mM RbCl_2 , 10 mM CaCl_2 und 15% Glycerol angesetzt. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 6,8 eingestellt. Der Puffer wurde in 40 ml-Aliquoten bei -20°C gelagert.

TBE-Puffer

18,6 g Na_2EDTA , 432 g Tris, 222,4 g Borsäure wurden mit Aqua dest. auf 2 l aufgefüllt und ein pH-Wert von 8,5 eingestellt. Dieser Puffer wurde 1:10 verdünnt und für die Gelelektrophorese eingesetzt.

Trypanblau-Lösung

Von einer Stammlösung (0,1% (w/v) Trypanblau und 0,01% (w/v) NaN_3) wurde eine Gebrauchslösung in einem Verhältnis von 9:1 in 10 x PBS hergestellt.

TYRODES-Puffer (für den RBL-Test)

TYRODES-Puffer enthält 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ (x 6 H₂O), 1,4 mM CaCl₂ (x 6 H₂O), 5,6 mM Glucose, 10 mM HEPES und 0,1% BSA gelöst in deionisiertem Wasser. Dieser Puffer ist nur ca. eine Woche haltbar und wurde deshalb am Versuchstag frisch angesetzt.

2.1.4.2 Kulturmedien und Zusätze

In dieser Arbeit wurde mit frisch isolierten Zellen aus Mäusen gearbeitet, die *ex vivo* oder nach Kultivierung *in vitro* getestet wurden. Außerdem wurden Tests mit den Zelllinien NIH3T3 und RBL-2H3 durchgeführt. Zur Kultivierung dieser Zellen wurde den Puffern, Kultur- und Waschmedien fötales Kälberserum (FCS, fetal calf serum) zugesetzt. Dieses dient als Nährstoffquelle mit zum großen Teil noch unbekanntem, aber essentiellen Wachstumsfaktoren. Das Kälberserum wurde steril und mykoplasmenfrei bezogen. Es wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Manchen Medien wurden zusätzliche Nährstoffquellen wie Glutamin und Natriumpyruvat zugefügt. Ein wichtiger Zusatz, der allen Medien zugesetzt wurde und zum Schutz vor Verkeimung diente, war die Antibiotikamischung Penicillin/Streptomycin.

2-Mercaptoethanol (5 mM)

40 µl 2-Mercaptoethanol von Roth (Karlsruhe) wurden in 114 ml IMDM verdünnt und durch einen Filter mit der Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert. Diese Lösung wurde den Kulturmedien ein-prozentig (v/v) zugegeben.

EMEM („Eagle's Minimum Essential Medium“)

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

Fötales Kälberserum (FCS)

FCS wurde von PAN Biotech GmbH, Aidenbach, bezogen.

FCS wurde dem Kulturmedium 10% (v/v) und dem Waschmedium 2% (v/v) zugegeben.

Glutamin (200 mM)

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

IMDM ("Iscove's Modified Dulbecco's Medium")

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

Penicillin/Streptomycin (Pen / Strep)

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

BAL-Puffer

1 x PBS wurde mit 10% FCS versetzt. Dieser Puffer diente zur Lungenspülung.

Kulturmedium für Lymphknoten - und Milzzellen

IMDM wurde mit 10% (v/v) FCS (PAN Biotech GmbH), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol versetzt.

Kulturmedium für NIH3T3-Zellen

IMDM wurde mit 5% (v/v) FCS (PAN Biotech GmbH), 1% (v/v) Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol versetzt.

Kulturmedium für RBL-Zellen

IMDM wurde mit 10% (v/v) FCS (PAN Biotech GmbH), 1% (v/v) Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol versetzt.

Waschmedium

EMEM versetzt mit 2% (v/v) FCS (PAN Biotech GmbH), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin wurde zum Waschen frisch isolierter Milz- und Lymphknotenzellen sowie kultivierter Zellelinien benutzt.

2.1.4.3 Medien und Nährböden für die Bakterienkultur

LB (Luria Bertani)-Agar

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

LB (Luria Bertani)-Medium (flüssig)

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

2.1.4.4 ELISA-Puffer und -Lösungen

0,1 M NaHCO₃-Puffer (Beschichtungspuffer)

8,401 g NaHCO₃ wurden in einem Liter deionisiertem Wasser gelöst und auf einen pH-Wert von 8,2 eingestellt. In diesem Puffer wurden die „Capture“-Antikörper zur Beschichtung der Vertiefungen in den Mikrotiterplatten auf die geeignete Konzentration verdünnt.

Blockierungs- und Verdünnungspuffer (PBS/1% BSA)

1 g BSA (Bovines Serum Albumin) wurde in 100 ml 1 x PBS gelöst. Diese 1% BSA-Lösung wurde zum Absättigen freier Valenzen auf der Mikrotiterplatte, welche nicht durch die „Capture“-Antikörper blockiert wurden, benutzt. Außerdem wurden Detektions-antikörper, Enzym und Zytokine für den ELISA in dieser Lösung verdünnt.

OPD-Substratpuffer

15,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ und 14,7 g tri-Na-Citrat $\times 2\text{H}_2\text{O}$ wurden in 500 ml deionisiertem Wasser gelöst und auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt. In diesem Puffer wurde das Substrat OPD gelöst. Als Kosubstrat wurde außerdem 30% H_2O_2 kurz vor der Entwicklung des ELISA in einer Konzentration von 1 $\mu\text{l/ml}$ zugesetzt.

Stop-Lösung (1 M H_2SO_4)

In 947 ml entionisiertes Wasser wurden 53 ml konzentrierte Schwefelsäure (H_2SO_4) gegeben. Mit dieser Lösung wurde der Substratumsatz beim ELISA abgestoppt.

ELISA-Waschpuffer

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

2.1.4.5 Lösungen für die Herstellung von Gen-Pistolen-Patronen

1M CaCl_2

147,02 g CaCl_2 wurden in einem Liter Aqua dest. gelöst. Diese Lösung (1 M) wurde zum Koppeln von DNA an Goldpartikel verwendet.

Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Ethanol-Lösung

Zur Herstellung einer Stammlösung wurden 20 mg PVP pro ml absolutem Ethanol angesetzt. Für die Gebrauchslösung wurde diese auf eine Konzentration von 0,075 mg/ml in absolutem Ethanol verdünnt.

Spermidin-Lösung (0,05 M)

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

2.1.4.6 Fertigsysteme

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

System	Hersteller
NucleoSpin [®] RNAII Total RNA Isolation Kit	Machery-Nagel, Düren
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.4.7 Plasmidvektoren

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

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 FACS-Isotypkontrollantikörper

Antikörper	Klon	Markierung	Verdünnung	Hersteller
Ratte-IgG2a	R35-95	Biotin	1:100	Pharmingen. Heidelberg
Ratte-IgG2a	R35-95	FITC	1:100	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-IgG2a	R35-95	PE	1:100	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

Antikörper	Klon	Markierung	Verdünnung	Hersteller
Ratte-IgG2a	R35-95	Cy5	1:100	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-IgG2b, κ		-	1:50	NatuTec, Frankfurt / Main
Ratte-IgG2b, κ		FITC	1:50	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Hamster-IgG1	A19-3	PE	1:100	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Hamster-IgG1	G235-2356	FITC	1:100	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

2.1.5.2 FACS-Primärantikörper (anti-Maus)

Antikörper gegen	Klon	Isotyp	Markierung	Verdünnung	Hersteller
CD3	145-2C11	Hamster- IgG1*, κ	PE	1:50	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
CD4	GK1.5	Ratte- IgG2b	FITC	1:25	Miltenyi Biotec, Bergisch- Gladbach
CD4	GK1.5	Ratte- IgG2b	PE	1:25	Miltenyi Biotec, Bergisch- Gladbach
CD4	RM4-5	Ratte- IgG2a, κ	Cy5	1:50	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

Antikörper gegen	Klon	Isotyp	Markierung	Verdünnung	Hersteller
CD8a	53-6.7	Ratte-IgG2b	FITC	1:25	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD8a	53-6.7	Ratte-IgG2b	PE	1:25	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD8a	53-6.7	Ratte-IgG2a, κ	Cy5	1:50	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
CD11c	HL3	Hamster-IgG1*, κ	PE	1:20	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
CD25	PC61 5.3	Ratte-IgG1	PE	1:100	Caltag Laboratories, Burlingame
CD28	37.51.1	Hamster-IgG	Biotin	1:50	Caltag Laboratories, Burlingame
CD45R	RA3-6B2	Ratte-IgG2a	FITC	1:25	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CTLA-4	63828	Ratte-IgG2a	FITC	10 µl unverdünnt auf 2×10^5 Zellen	R&D Systems
GITR	108619	Ratte-IgG2a	FITC	10 µl unverdünnt auf 2×10^5 Zellen	R&D Systems
γδ-TCR	GL3	Hamster-IgG*, κ	Biotin	1:50	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

2.1.5.3 Streptavidin (SA)-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate für die FACS-Färbung

SA-Konjugat	Verdünnung	Hersteller / Vertreiber
SA-DTAF	1:100	Dianova, Hamburg
SA-PE	1:100	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

2.1.5.4 Antikörper für Zytokin-ELISA und IFN- γ -ELISpot

2.1.5.4.1 „Capture“-Antikörper

„Capture“-Antikörper	Isotyp	Klon	Konzentration (Einsatzkonzentration) und Puffer	Hersteller (Referenz)
Anti-Maus IFN- γ (für ELISpot)	Ratte-IgG1	R4-6A2	1 mg/ml (2 μ g/ml) in sterilem 1x PBS	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus IFN- γ (für ELISA)	Ratte-IgG1	R4-6A2	(1:1000 verdünnt) in 0,1 M NaHCO ₃	(Spitalny und Havell, 1984)
Anti-Maus IL-4	Ratte-IgG1	11B11	0,5 mg/ml (1 μ g/ml) in 0,1 M NaHCO ₃	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus/ Mensch IL-5	Ratte-IgG1	11B11	0,5 mg/ml (1 ng/ml) in 0,1 M NaHCO ₃	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus IL-10	Ratte-IgG2b, κ	JESS-16E3	0,5 mg/ml (1 ng/ml) in 1x PBS	NatuTec, Frankfurt

„Capture“- Antikörper	Isotyp	Klon	Konzentration (Einsatzkonzentration) und Puffer	Hersteller (Referenz)
Anti-Maus IL-13	Ratte- IgG2b	38213	0,5 mg/ml (2 ng/ml) in 1x PBS	R&D Systems
Rekombinante humane TGFβ sRII/Fc Chimäre	-	-	0,5 mg/ml (0,2 ng/ml) in 1x PBS	R&D Systems

2.1.5.4.2 Detektionsantikörper

Detektions- Antikörper	Isotyp	Klon	Konzentration (Einsatzkonzentration) und Inkubationsbedingungen	Hersteller (Referenz)
Anti-Maus IFN-γ, biotinyliert	Ratte- IgG1	AN18.17.24	(1:5000 verdünnt) 60 min, 37 °C	(Cherwinski <i>et al.</i> , 1987)
Anti-Maus IL-4, biotinyliert	Ratte- IgG1	BVD6-24G2	0,5 mg/ml (0,5 µg/ml) 60 min, 37 °C	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus IL-5, biotinyliert	Ratte- IgG2a	TRFK4	0,5 mg/ml (1 µg/ml) 60 min, 37 °C	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus IL-10, biotinyliert	Ratte- IgG1, κ	JESS-2A5	0,5 mg/ml (0,5 µg/ml) 60 min, RT	NatuTec, Frankfurt

Detektions-Antikörper	Isotyp	Klon	Konzentration (Einsatzkonzentration) und Inkubationsbedingungen	Hersteller (Referenz)
Anti-Maus IL-13, biotinyliert	Ziege-IgG	-	50 µg/ml (0,1 µg/ml) 2h, RT	R&D Systems
Anti-Mensch TGFβ, biotinyliert	Huhn-IgY	-	50 µg/ml (0,1 µg/ml) 2h, RT	R&D Systems

2.1.5.5 Antikörper für Immunglobulin-ELISA

Antikörper	Klon* bzw. Artikel- nummer	Konzentration (Einsatzkonzentration)	Hersteller (Referenz)
Ziege-anti-Maus IgG1, biotinyliert	1070-08	1 mg/ml (0,2 µg/ml)	Biozol, Eching
Ziege-anti-Maus IgG2a, biotinyliert	1080-08	1 mg/ml (0,2 µg/ml)	Biozol, Eching
Ratte-anti-Maus IgE	EM95-3*	1 mg/ml (1 µg/ml)	BANIYASH & ESHAR 1984
Maus-anti-Ratte IgG, F(ab'), biotinyliert	212-065- 106	2,2 mg/ml (2,2 mg/ml)	Dianova, Hamburg

2.1.5.6 MACS[®]-MicroBeads

Zur Aufreinigung verschiedener Zellpopulationen aus Lymphknoten- oder Milzzellpräparationen wurde die Methode der MACS-Separation angewendet. Dabei kamen diverse MACS[®]-MicroBeads von Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, zum Einsatz.

MACS [®] -MicroBeads	Antikörper gegen	Zur Aufreinigung von
CD8 (Ly-2) MicroBeads (# 130-049-401)	CD8	CD8 ⁺ T-Zellen (Positivselektion)
CD4 (L3T4) MicroBeads (# 130-049-201)	CD4	CD4 ⁺ T-Zellen (Positivselektion)
CD11c (N418) Microbeads (# 130-052-001)	CD11c	CD11c ⁺ dendritischen Zellen (Positivselektion)
CD90 (Thy1.2) Microbeads (# 130-049-101)	CD90	CD90 ⁺ T-Zellen, auch NKT-Zellen (Positivselektion)
PAN T Cell isolation Kit (# 130-090-932)	Cd11b, CD45R, DX5, Ter-119	T-Zellen (Negativselektion)
CD43 (Ly-48) Microbeads	CD43	B-Zellen (Negativselektion)

2.1.6 Zytokine

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

Zytokin	Artikelnummer	Konzentration (Startkonzentration)	Hersteller
rekombinantes murines IFN- γ	#19301T	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (5 ng/ml)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
rekombinantes murines IL-4	19231W	0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5 ng/ml)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
rekombinantes murines IL-5	#14-8051-62	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2 ng/mL)	NatuTec, Frankfurt
rekombinantes murines IL-10	14-7122	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (20 ng/ml)	NatuTec, Frankfurt
rekombinantes murines IL-13	413-ML-005	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5 ng/ml)	R&D Systems
rekombinantes humanes TGF β 1	100-21	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (10 ng/ml)	Tebu-bio

2.1.7 Peptide

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

2.1.8 Antigene

Antigen	Hersteller
“Keyhole limpet hemocyanine” (KLH)	Sigma, Deisenhofen
Ovalbumin (OVA), Hühnerei-Albumin	Calbiochem, La Jolla, USA
β -Galaktosidase	Sigma, Deisenhofen
β -Galaktosidase	Roche; Mannheim

2.1.9 Enzyme

2.1.9.1 Allgemeine Enzyme

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

2.1.9.2 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA sequenzspezifisch. Die folgenden Restriktionsenzyme wurden für die unter 3.3.1 beschriebenen Klonierungen und für Testverdauung verwendet.

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller
Bam HI	G/GATCC	Fermentas
Bgl II	A/GATCT	Fermentas
Eco RI	G/AATTC	Fermentas
Eco RV	GAT/ATC	Fermentas
Hind III	A/AGCTT	Fermentas
Nco I	C/CATGG	Fermentas
Nhe I	G/CTAGC	Fermentas
Not I	GC/GGCCGC	Fermentas
Xho I	C/TCGAG	Fermentas
Xmn I	GAANN/NNTTC	Fermentas

2.1.10 Primer

2.1.10.1 Primer für die Realtime-PCR

Murines Zielgen	Primer-Sequenz
UBC	Sense: 5'-GTCTGCTGTGTGAGGACTGC-3' Antisense: 5'-CAGGGTGGACTCTTTCTGGA-3'
HPRT	Sense: 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3' Antisense: 5'-GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT-3'
IL-10	Sense: 5'-CCAAGCCTTATCGGAAATGA-3' Antisense: 5'-TTTTCACAGGGGAGAAATCG-3'
TGFβ1	Sense: 5'-TTGCTTCAGCTCCACAGAGA3' Antisense: 5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGGC-3'
FoxP3	Sense: 5'-CTCATCCGATGGGCCATCCTGGAA-3' Antisense: 5'-TTCCAGGTGGCGGGGTGGTTTCTG-3'

2.1.10.2 Primer für die konventionelle PCR

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

Murines Zielgen	Primer-Sequenz
OVA	Sense: 5'-CTTGCCAGTAGACTTTATGC-3' Antisense: 5'-CGAATCCTGGAAGTTTATC-3'

Die Primer für die Amplifikation von HPRT, mL-10 und mTGF- β 1 waren dieselben, die auch in der Realtime PCR verwendet wurden.

2.1.11 Versuchstiere

Für die meisten Versuche in dieser Arbeit wurden Mäuse des Inzuchtstammes BALB/cJ verwendet. Außerdem kamen C57BL/6-Mäuse (Genotyp H-2^b) sowie IL12p40- und Interferon- γ -knockout-Mäuse mit dem genetischen Hintergrund von C57BL/6 zum Einsatz.

Die Tiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz gezüchtet.

Alle Versuchstiere leben unter SPF-Bedingungen (specific pathogen free) und werden durch entsprechende Hygienemaßnahmen von pathogenen Organismen isoliert gehalten.

Es wurden immer Mäuse weiblichen Geschlechts (Ausnahme Interferon- γ -knockout-Mäuse, männlich) verwendet, die zu Versuchbeginn 6 -10 Wochen alt waren.

2.1.12 Zelllinien

2.1.12.1 NIH3T3

Die NIH3T3-Zelllinie ist eine Fibroblastenzelllinie, die für die ersten Funktionsanalysen der unter 3.3.1 beschriebenen Expressionskonstrukte pCMV-IL-10, pFascin-IL-10, pCMV-IL-10-IRES-cOVA, pFascin-IL-10-IRES-cOVA sowie pCMV-TGF β 1, pFascin-TGF β 1, pCMV-TGF β 1-IRES-cOVA und pFascin-TGF β 1-IRES-cOVA als Zielzellen verwendet wurde. Diese Zellen lassen

sich effizient transfizieren und können sowohl den CMV- als auch den Fascinpromoter transkribieren.

NIH3T3 wurden in 10 ml NIH3T3-Medium (siehe 2.1.4.2) in 25 cm²-Zellkulturflaschen bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Zweimal pro Woche wurde der Kulturüberstand abgenommen und 10 ml frisches NIH3T3-Medium auf die Zellen gegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen bei Konfluenz vom Flaschenboden gelöst und dann mit einer Glaspipette resuspendiert. 2 ml der Zellsuspension wurden mit 8 ml frischem NIH3T3-Kulturmedium in eine neue 25 cm²-Zellkulturflasche pipettiert und weiter bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert.

2.1.12.2 RBL-2H3

RBL (**R**at **B**asophilic **L**eukemia)-Zellen sind basophile Granulozyten aus der Ratte und besitzen wie die Mastzellen den Rezeptor FcεRI. Somit kann man sie im RBL-Test (2.2.6.13) zum Nachweis funktionellen IgEs im Seren nutzen.

RBL-2H3-Zellen wurden in 10 ml RBL-2H3-Medium (siehe 2.1.4.2) in 25 cm²-Zellkulturflaschen bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die Zellen versorgt. Dazu wurde der Kulturüberstand abgenommen und der Flaschenboden mit 5 ml 1 x PBS abgespült. 2 ml 0,05% Trypsin/2 mM EDTA wurden auf den Zellrasen gegeben und 5 Minuten bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Dabei wurden die adhärenen Zellen gelöst. Die Zellen wurden anschließend mit 10 ml Waschmedium abgespült, in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 8 Minuten bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Danach wurden die Zellen noch zweimal in je 10 ml Waschmedium gewaschen und 8 Minuten bei 300 x g und 4°C abzentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 2,5 ml RBL-2H3-Kulturmedium aufgenommen und davon wurde ein Tropfen in eine 25 cm²-Zellkulturflasche mit 10 ml RBL-2H3-Medium pipettiert. Für einen RBL-Test (2.2.6.13) wurden drei Tropfen in eine 75 cm²-Zellkulturflasche mit 30 ml RBL-2H3-Medium pipettiert. Die Zellen mussten 3 – 4 Tage vor dem Test auf diese Weise ausgesät werden, damit sie eine optimale Zelldichte erreichen konnten.

2.1.13 Bakterienstamm

Es wurde der Bakterienstamm *Escherichia Coli TOP10* mit dem Genotyp $mcrA \Delta$ (mrr-hsd RMS-mcrBC) ϕ 80 lac Z Δ M 15 Δ lac X 74 deo R rec A I ara B 139 Δ (ara-lac) 7697 gal U gal K rpsI (strR) end AI nup G verwendet. Die Bakterien wurden in chemo- oder elektrokompetenter Form verwendet.

2.2 Tierversuche und zellbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Immunisierung mit der Genpistole

Die biolistische Transfektion ist eine Methode zur *in vivo*-Transfektion von Hautzellen. An Goldpartikel gekoppelte Plasmid-DNA wird dabei mit Hilfe von Heliumdruck über eine Genpistole in Zellen der rasierten Bauchhaut von lebenden Mäusen eingebracht.

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

Für die biolistische Transfektion von epidermalen Zellen wurde vorab Plasmid-DNA an Goldpartikel mit einem Durchmesser von 1,6 μ m gekoppelt. Dazu wurde zunächst endotoxinfreie DNA mit einer Midipräparation hergestellt und deren Konzentration bestimmt (siehe 2.3.4.4 und 2.3.5). Dann wurde errechnet, wie viele Patronen und somit wie viel Gold und DNA für den Versuch benötigt wurden. Pro Patrone wurden 1 mg Gold und 2 μ g DNA eingesetzt. Die entsprechende Goldmenge wurde in ein endotoxinfreies 1,5 ml Eppendorf-Gefäß eingewogen und dann in 100 μ l 0,05 M Spermidinlösung zehn Sekunden im Ultraschallbad verfeinert. Danach wurde die berechnete DNA-Menge hinzugegeben und gut durch Vortexen gemischt. Nach rascher Zugabe von 100 μ l 1 M $CaCl_2$ -Lösung wurde die Suspension erneut gut gemischt und durch zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur präzipitiert. Das DNA-Gold-Gemisch wurde 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert und der

Überstand wurde sorgfältig abpipettiert. Das Sediment wurde nachfolgend noch dreimal durch Resuspension in 1 ml absoluten Ethanol gewaschen. Danach wurde das Sediment in mehreren Pipettierschritten mit insgesamt 1,75 ml pro 30 Patronen einer 0,075 mg/ml Polyvinylpyrrolidon (PVP)/Ethanol-Lösung gemischt und in ein 15 ml-Probenröhrchen überführt. PVP wirkt dabei in einer Konzentration von 0,01 bis 0,1 mg/ml als Klebstoff, der die Adhäsion der Gold-DNA-Komplexe an den Plastikschauch gewährleistet. Ein spezieller Plastikschauch (Tefzel Tubing, Bio-Rad) wurde mit Hilfe einer 50 ml Einmalspritze mit der Gold-DNA-PVP-Lösung beladen und vorsichtig in die entsprechende Präparierstation (BioRad) geschoben. Der Plastikschauch wurde fünf Minuten ruhen gelassen, so dass sich die Gold/DNA-Komplexe absetzen konnten. Danach wurde der Ethanol mit einer 50 ml Einmalspritze aus dem Schlauch entfernt. Durch Begasung mit Stickstoff wurde der Schlauch getrocknet, dann aus der Station entnommen und mittels eines speziellen Schneidegerätes (BioRad) in gleichgroße Patronen zum Beladen der Genpistole geschnitten.

2.2.1.2 Durchführung der biologistischen Transfektion

Die Bauchhaut der Versuchsmäuse wurde vorab mit einem elektrischen Rasierer sorgfältig rasiert. Die Genpistole wurde an eine Helium-Gasflasche angeschlossen und ein Arbeitsdruck von 400 psi eingestellt. Dann wurde der Revolver der Genpistole mit den hergestellten Patronen beladen. Jede Maus wurde normalerweise pro Immunisierung mit zwei Patronen auf nicht überlappenden Arealen beschossen. Die Goldpartikel waren auf der Haut der Mäuse gut sichtbar. Im Abstand von je einer Woche wurden die Mäuse dreimal mit der Genpistole immunisiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass nie dieselbe Hautstelle mehrmals beschossen wurde.

2.2.2 Protein-Immunisierungsmethoden

2.2.2.1 Herstellung der Proteinlösungen für die Immunisierung der Versuchstiere

Zur Immunisierung der Versuchstiere wurden drei verschiedene Proteine verwendet. Keyhole limpet hemocyanine (KLH) und β -Galactosidase (β Gal) wurden von der Firma Sigma in lyophilisierter Form bezogen. KLH wurde in sterilem 1 x PBS gelöst und zum Zwecke der Immunisierung auf die Konzentrationen 1 mg/ml (K100) und 1 μ g/ml (K01) eingestellt. β Gal wurde in sterilem deionisiertem Wasser nach Herstellerangaben gelöst und in sterilem 1 x PBS auf die Konzentrationen 1 mg/ml und 10 μ g/ml eingestellt.

BSA (PAA Laboratories) wurde auf der Analysewaage abgewogen, in 1 x PBS aufgelöst, auf 10 mg/ml Konzentration eingestellt und sterilfiltriert.

OVA (Calbiochem, La Jolla, USA) wurde auf der Analysewaage abgewogen und in 1 x PBS aufgelöst. Es wurde immer zunächst eine Lösung angesetzt, die eine höhere als die benötigte OVA-Konzentration enthielt. Diese wurde sterilfiltriert. Da beim Sterilfiltrieren ein Teil des Proteins im Filter adsorbiert, wurde anschließend ein Bradford-Test zur Bestimmung der tatsächlichen Proteinkonzentration durchgeführt (siehe 2.2.2.2). Dann wurden durch Verdünnen in 1 x PBS verschiedene OVA-Konzentrationen (20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1 mg/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml und 1 μ g/ml) eingestellt.

Alle Proteine wurden stets bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.2 Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Zur Überprüfung und zum Einstellen der Konzentration der Ovalbumin-Lösung wurde eine photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford [Bradford, 1976] durchgeführt. Da beim Sterilfiltrieren der Ovalbuminlösung ein Teil des Proteins im Filter adsorbiert, wurde eine höhere als die gewünschte OVA-Konzentration angesetzt. Erst nach der exakten Bestimmung der OVA-Konzentration mit Hilfe des Bradford-Tests wurde die benötigte Konzentration eingestellt. Zum

Vergleich mit der Probe diente eine Kalibrierungsgerade mit dem Standard BSA (Stammlösung 1 mg/ml) mit den Konzentrationen 1, 4, 8, 12, 16, 20 und 24 µg/ml. Für die zu testende Probe wurde eine Soll-Konzentration gewählt, die in diesen Bereich lag. Es wurden drei Messverdünnungen der Probe angesetzt, um auszuschließen, dass ein falscher Wert aufgrund von Pipettierungenauigkeiten erhalten wird.

Zum Proteinnachweis wurde das Reagenz Roti-Quant[®] (5-fach konzentriert) verwendet, welches stöchiometrisch an Proteine bindet und dabei eine Blaufärbung verursacht, die im Photometer bei 595 nm gemessen werden kann. Zu 800 µl Proteinlösung wurden 200 µl Roti-Quant[®] pipettiert. Nach fünfminütiger Inkubation wurde das Gemisch in 1 ml Einmalküvetten überführt und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Referenz diente die Leerprobe mit 200 µl Roti-Quant[®] und 800 µl deionisiertem Wasser. Anhand der um den Achsenabschnitt korrigierten BSA-Kalibrierungsgerade und der gemittelten OD₅₉₅-Werte der Probenverdünnungen, konnte die OVA-Konzentration ermittelt werden.

2.2.2.3 Proteinimmunisierung durch Injektion

2.2.2.3.1 Intraperitoneale Immunisierung mit KLH und OVA zur Untersuchung des Dosiseffekts

In diesen Experimenten wurde die Immunreaktion der Mäuse auf hohe und niedrige Proteindosen untersucht.

Dazu wurde KLH in den Konzentrationen 1 mg/ml (K100) und 1 µg/ml (K01) bzw. OVA in den Konzentrationen 10 mg/ml, 1 mg/ml, 100 µg/ml, 10 µg/ml und 1 µg/ml im Verhältnis 1:2 mit Aluminiumhydroxid (Imjekt[®] Alum, Perbio, Wien) gemischt. 200 µl dieser Suspension wurden den Mäusen mit einer 1 ml-Feindosierungsspritze in den Bauchraum injiziert.

2.2.2.3.2 Intraperitoneale Immunisierung mit β Gal

β Gal wurde in der Konzentration 10 μ g/ml verwendet und im Verhältnis 1:2 mit Aluminiumhydroxid (Imjekt[®] Alum, Perbio, Wien) gemischt. 200 μ l dieser Suspension wurden den Mäusen mit einer 1 ml-Feindosierungsspritze in den Bauchraum injiziert.

2.2.2.3.3 Intraperitoneale und subkutane Immunisierung mit OVA und BSA im Asthmaversuch

2.2.2.3.3.1 Sensibilisierung

OVA wurde in der Konzentration 10 μ g/ml verwendet und im Verhältnis 1:2 mit Aluminiumhydroxid (Imjekt[®] Alum, Perbio, Wien) gemischt. 200 μ l dieser Suspension wurden den Mäusen mit einer 1 ml-Feindosierungsspritze in den Bauchraum injiziert.

2.2.2.3.3.2 Therapeutische Injektionen

Die Mäuse erhielten therapeutische Injektionen von 1 mg OVA adsorbiert an Alum i.p. bzw. s.c. oder 1 mg OVA ohne Adjuvans s.c.. Zur intraperitonealen Injektion wurde OVA in der Konzentration 10 mg/ml verwendet und im Verhältnis 1:2 mit Aluminiumhydroxid (Imjekt[®] Alum, Perbio, Wien) gemischt. 200 μ l dieser Suspension wurden den Mäusen mit einer 1 ml-Feindosierungsspritze in den Bauchraum injiziert. Zur subkutanen Injektion von OVA adsorbiert an Alum wurde OVA in der Konzentration 20 mg/ml verwendet und im Verhältnis 1:2 mit Aluminiumhydroxid (Imjekt[®] Alum, Perbio, Wien) gemischt (OVA-Endkonzentration 10 mg/ml). 100 μ l dieser Suspension wurden den Mäusen mit einer 1 ml-Feindosierungsspritze subkutan in den Nacken injiziert. Zur subkutanen Injektion von OVA ohne Adjuvans wurden 100 μ l OVA-Lösung in der Konzentration 10 mg/ml den Mäusen mit einer 1 ml-Feindosierungsspritze subkutan in den Nacken injiziert.

Kontrollgruppen bekamen subkutane Injektionen von 1 mg BSA adsorbiert an Alum. 100 μ l BSA-Lösung in der Konzentration 10 mg/ml wurden den Mäusen mit einer 1 ml-Feindosierungsspritze subkutan in den Nacken injiziert.

2.2.2.4 Intranasale (i.n.) Applikation von OVA

Die Versuchsmäuse wurden durch eine i.p. Injektion von 200 µl bis 250 µl (je nach Gewicht und Größe des Tiers) einer 2,5-prozentigen Avertin-Lösung sediert. Den betäubten Tieren wurden 50 µl einer OVA-Lösung (5 mg/ml in 1 x PBS) oder der Kontrolllösung 1x PBS tröpfchenweise auf die Nase gegeben, bis die Lösung von den Mäusen vollständig eingeatmet war.

2.2.3 Transfer von Milzzellen und Milzzellpopulationen

Frisch isolierte Milzzellen (2.2.6.3.3) sowie aus diesen Milzzellen mittels MACS-Technologie magnetisch aufgereinigte Zellpopulationen (2.2.6.5) wurden in 1 x PBS gewaschen und 10 min bei 300 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellsediment wurde auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und in 200 µl sterilem 1 x PBS pro Rezipient gut resuspendiert und unter Verwendung einer 1 ml Einmalspritze in die Schwanzvene naiver Mäuse injiziert. Die Rezipienten wurden zuvor mit Hilfe einer Rotlichtlampe erwärmt, um eine Erweiterung der Venen herbeizuführen.

2.2.4 Serumgewinnung

Den Versuchsmäusen wurde mit Hilfe einer Glaspasteurpipette Blut aus dem Augenhintergrund entnommen und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen aufgefangen. Zur Defibrinierung wurde das frische Blut mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Mit Hilfe einer schmalen Pinzette wurde der entstandene Blutkuchen entfernt und das Serum durch zehnmünütige Zentrifugation bei 10.000 Upm von den restlichen zellulären Bestandteilen abgetrennt. Anschließend wurde das Serum (klarer Überstand) abgenommen, in ein neues 0,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Analyse im Immunglobulin-ELISA (2.2.6.12) oder RBL-Test bei -20°C gelagert.

2.2.5 Nicht-invasive Messung der Atemwegsreaktivität

Die Atemwegsreaktivität (AR) bezeichnet eine Verengung der Atemwege aufgrund eines Reizes. Dieser Vorgang dient der Anpassung der Ventilation auf die Perfusionsverhältnisse in den Atemwegen. Außerdem wird so ein Schutz des Lungengewebes vor dem Eindringen toxischer Substanzen gewährleistet. Wenn die AR allerdings über das normale, gesunde Maß hinaus erhöht ist, hat man es mit einer Atemwegshyperreaktion (AHR) zu tun. Diese Fehlfunktion kann man z.B. bei Asthmatikern beobachten. Zur Ermittlung einer möglichen AHR unterzieht man die Versuchstiere einer Lungenfunktionsmessung bei gleichzeitiger Provokation mit aerosolisiertem Methacholin (MCh). So kann man untersuchen, ob und wie schnell die Atemwege mit einer AHR reagieren.

In den Asthmaexperimenten dieser Arbeit wurden die Versuchsmäuse einer Lungenfunktionsmessung mit der nicht-invasiven Methode unterzogen (Asthma Core Facility). Die Messung der Atemwegshyperreaktivität erfolgte 24 Stunden nach der letzten intranasalen Provokation der Versuchstiere in einem Ganzkörper-Plethysmographen. Die Mäuse wurden einzeln in die Plexiglaskammer des Plethysmographen gesetzt. Für jedes Tier wurde der Druck (P) in der Kammer gemessen. Durch die Atembewegungen des Brustkorbes der Tiere wurde die Luft der Kammer komprimiert und wieder gedehnt. Mit dem am Ableitungsrohr des Plethysmographen befindlichen Pneumotachographen konnten diese geringen Druckänderungen in der Kammer gemessen werden. Durch ein Potentiometer wurden die Messwerte verstärkt und an einen Computer weitergeleitet.

Zum Erstellen der Basislinie wurde am Anfang jeder Messung der Atemstrom der Mäuse für 5 Minuten ohne Methacholinstimulation gemessen. Von den Werten dieser Messphase wurden die Mittelwerte bestimmt. Anschließend wurde drei Minuten lang aerosolisiertes Methacholin einer bestimmten Konzentration (6,25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml und 50 mg/ml in 1 x PBS) in die Messkammer geleitet. Die Mäuse wurden dem Methacholinreiz für fünf Minuten ausgesetzt. In dieser Zeit wurden 30 Werte aufgezeichnet und anschließend gemittelt. Vor der Verabreichung der nächsthöheren Methacholindosis wurde jeweils eine Pause von sieben Minuten eingehalten.

Aus dem Abfall von P in der Kammer bei Obstruktion der Bronchien und dem Verhältnis der P-Maxima bei Inspiration und Expiration der Mäuse ließ sich ein dimensionsloser Parameter, die sogenannte „enhanced pause“ (Penh), berechnen. Der Penh-Wert steigt bei Obstruktion an.

2.2.6 Zellbiologische Methoden

2.2.6.1 Kulturbedingungen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich sterile Glas- und Plastikwaren verwendet. Die Zellkultivierung erfolgte in einem CO₂-begasteten Inkubator bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 10% in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre.

2.2.6.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

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

2.2.6.3 Präparation von lymphoiden Organen

Die Versuchsmäuse wurden per Genickbruch oder, wenn eine Lungenspülung durchgeführt wurde, mit CO₂ getötet.

2.2.6.3.1 Präparation von Lymphknotenzellen

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

Die Lymphknoten wurden steril entnommen, sofort in kaltes Waschmedium (siehe 2.1.4.2) gegeben und zwischen den rauen Seiten zweier abgeflammter Objektträger zerrieben. Die entstandene Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (40 µm) gegeben und so Bindegewebsaggregate entfernt. Die Zellsuspension wurde bei 300 x g und 4°C 7 Minuten zentrifugiert. Dann wurde das Zellsediment in Kulturmedium (siehe 2.1.4.2) aufgenommen und die Lebendzellzahl bestimmt (siehe 2.2.6.2).

2.2.6.3.2 Präparation von Milzzellen

Die Milz wurde steril entnommen, sofort in kaltes Waschmedium (siehe 2.1.4.2) gegeben und mit gezähnten Pinzetten fein zerzupft. Die entstandene Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (40 µm) gegeben und so Bindegewebsaggregate entfernt. Die Zellsuspension wurde bei 300 x g und 4°C sieben Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zur Lyse der dünnwandigen Erythrozyten in hypotonischem Gey's Lysepuffer (1 ml pro Milz) resuspendiert. Die Reaktion musste nach einer Minute abgestoppt werden, um die Schädigung der Leukozyten zu verhindern. Dazu wurde das fünffache Volumen Waschmedium zugegeben und die Suspension bei 300 x g und 4°C sieben Minuten zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellsediment in Kulturmedium (siehe 2.1.3.2) aufgenommen und die Lebendzellzahl bestimmt (siehe 2.2.6.2).

2.2.6.4 Antigen-spezifische Stimulation von Milz- und Lymphknotenzellen

Um die antigen-spezifische Zytokinproduktion von Milz- und Lymphknotenzellen bestimmen zu können, wurden diese Zellen über einen Zeitraum von 72 Stunden *in vitro* stimuliert. Dazu wurden 5×10^6 Zellen in einem Gesamtvolumen von 1 ml in

Vertiefungen einer 24-Loch-Kulturplatte bzw. $2 - 2,5 \times 10^6$ Zellen in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml in Vertiefungen einer 48-Loch-Kulturplatte in Kulturmedium (siehe 2.1.3.2) zusammen mit dem relevanten Antigen (KLH 1 µg/ml, βGal 50 µg/ml, OVA 200 µg/ml) für 72 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Als Kontrolle dienten Kulturen ohne die Zugabe des Proteins. Nach 72 Stunden Inkubation wurden 800 µl (24-Lochplatte) bzw. 400 µl (48-Lochplatte) Überstand je Vertiefung entnommen und auf 48-Loch-Kulturplatten bei -20°C bis zur Zytokinbestimmung mittels ELISA aufbewahrt.

2.2.6.5 Aufreinigung von Zellpopulationen aus Organzellsuspensionen mit der MACS[®]-Technologie

Spezifische Zellpopulationen wurden mit der MACS[®]-Technologie aus Milz- oder Lymphknotengewebe isoliert. Der Aufreinigung lagen die MACS[®]-Protokolle der Firma Miltenyi Biotec zugrunde. Alle Schritte der magnetischen Markierung und Separierung wurden mit gekühlten Lösungen durchgeführt, um ein Internalisieren der MicroBeads zu vermeiden. Nach Präparation von Milz- und Lymphknotenzellen (siehe 2.2.6.3) und Bestimmung der Lebendzellzahl (siehe 2.2.6.2) wurde die Zellsuspension bei 300 x g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellsediment aufgebrochen und in eiskaltem MACS-Puffer (siehe 2.1.4.1) aufgenommen.

2.2.6.5.1 Positivseparation von CD90⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Bei der positiven Anreinigung sind monoklonale Antikörper, welche hochaffin an charakteristische Zelloberflächenmoleküle binden, mit magnetischem Material gekoppelt. Diese sogenannten MicroBeads wurden zu der Suspension der zu isolierenden Zellen gegeben (900µl MACS-Puffer und 100 µl MicroBeads auf 10^8 Zellen). Während einer 15-minütigen Inkubation bei 4°C banden diese an die entsprechenden Moleküle auf der Zelloberfläche. Anschließend wurde die mit den MicroBeads versehene Zellsuspension mit dem zehnfachen Volumen MACS-Puffer gewaschen und zehn Minuten bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Für die

anschließende magnetische Separation wurde eine MS-Trennsäule (für maximal 10^8 unseparierte Zellen) gewählt und in das magnetische Feld eines OctoMACS™-Separators platziert. Die MS-Trennsäule wurde mit 500 μ l MACS-Puffer equilibriert. Das Zellsediment wurde in 500 μ l MACS-Puffer pro 10^8 Zellen aufgenommen und auf die Säule geladen. Die magnetisch markierten Zellen wurden in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen die Säule durchwanderten. Nach diesem Prozess wurde die Säule dreimal mit 500 μ l MACS-Puffer gespült und aus dem Magnetfeld entfernt. Mit Hilfe eines Stempels und 500 μ l MACS-Puffer wurden die Zielzellen aus der Säule herausgedrückt. Die Zellen wurden für zehn Minuten bei 300 x g und 4 °C abzentrifugiert und das Zellsediment wurde in Kulturmedium (siehe 2.1.3.2) aufgenommen. Abschließend wurde die Zellzahl der separierten Zellen bestimmt (siehe 2.2.6.2).

2.2.6.5.2 Negativseparation von T-Zellen

Bei der negativen Isolation wurde eine Mischung verschiedener biotinylierter monoklonaler Antikörper (CD45R (B220), CD49b (DX5), CD11b (Mac-1), Ter-119) zur Zellsuspension gegeben, die spezifisch an Oberflächenmoleküle von APC, NK-Zellen, NKT-Zellen banden, die man aus der Suspension entfernen wollte. Mit diesem Antikörper-Cocktail (400 μ l MACS-Puffer und 100 μ l Antikörper-Cocktail auf 10^8 Zellen) wurden die Zellen 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. In einem zweiten Schritt wurden anti-Biotin-MicroBeads (300 μ l MACS-Puffer und 200 μ l anti-Biotin-MicroBeads auf 10^8 Zellen) dazugegeben, welche während weiterer 15 Minuten Inkubation bei 4 °C an die biotinylierten Antikörper banden. Anschließend wurde die mit den MicroBeads versehene Zellsuspension mit dem zehnfachen Volumen MACS-Puffer gewaschen und zehn Minuten bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Für die anschließende magnetische Separation wurde eine LS-Trennsäule (für maximal 10^9 unseparierte Zellen) gewählt und in das magnetische Feld eines MACS™-Separators platziert. Die MS-Trennsäule wurde mit 500 μ l MACS-Puffer equilibriert. Das Zellsediment wurde in 3 ml MACS-Puffer pro 10^9 Zellen aufgenommen und auf die Säule geladen. Die magnetisch markierten Zellen wurden in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten T-Zellen die Säule durchwanderten. Die Säule wurde noch dreimal mit 1 ml MACS-Puffer gespült, damit alle unmarkierten

T-Zellen aus der Säule fließen konnten. Die unmarkierten Zielzellen wurden beim Verlassen der Säule aufgefangen und dann für zehn Minuten bei 300 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Kulturmedium (siehe 2.1.4.2) aufgenommen. Abschließend wurde die Zellzahl der separierten Zellen bestimmt (siehe 2.2.6.2).

2.2.6.5.3 Negativselektion von B-Zellen

Die negative Isolation von B-Zellen funktioniert ähnlich wie die unter 2.2.6.5.1 beschriebene Postivselektion diverser T-Zell-Populationen. Monoklonale Antikörper gegen CD43, welche hochaffin an die Zelloberfläche von Nicht-B-Zellen binden, sind mit MicroBeads gekoppelt. Diese CD43-MicroBeads wurden zu der Suspension der zu isolierenden Zellen gegeben (900 µl MACS-Puffer und 100 µl MicroBeads auf 10^8 Zellen) und 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem zehnfachen Volumen MACS-Puffer gewaschen und zehn Minuten bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Für die anschließende magnetische Separation wurde eine MS-Trennsäule (für maximal 10^8 unseparierte Zellen) gewählt und in das magnetische Feld eines OctoMACS™-Separators platziert. Die MS-Trennsäule wurde mit 500 µl MACS-Puffer equilibriert. Das Zellsediment wurde in 500 µl MACS-Puffer pro 10^8 Zellen aufgenommen und auf die Säule geladen. Die magnetisch markierten Zellen wurden in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten B-Zellen die Säule durchwanderten. Die unmarkierten Zellen wurden beim Verlassen der Säule aufgefangen. Nach diesem Prozess wurde die Säule dreimal mit 500 µl MACS-Puffer gespült und der Durchfluss weiter aufgefangen. Die separierten Zellen wurden für zehn Minuten bei 300 x g und 4 °C abzentrifugiert und das Zellsediment wurde in Kulturmedium (siehe 2.1.4.2) aufgenommen. Abschließend wurde die Lebendzellzahl der separierten Zellen bestimmt (siehe 2.2.6.2).

2.2.6.5.4 Aufreinigung von CD4/CD8 doppelt negativen T-Zellen (dnTZ)

Dazu wurde zunächst die unter 2.2.6.5.2 beschriebene Negativselektion von T-Zellen durchgeführt. Im Säulendurchfluss befanden sich nach diesem Isolationsschritt

unmarkierte aufgereinigte T-Zellen, die in einem zweiten Schritt zur Depletion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eingesetzt wurden. Diese erfolgte wie unter 2.2.6.5.1 beschrieben. Die Bead-Mengen wurden hierbei an den höheren Prozentsatz CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu den Gesamtmilzzellen angepasst. Pro 3×10^8 T-Zellen wurden 1 ml CD4- und 1 ml CD8-Microbeads eingesetzt. Die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden in der Säule zurückgehalten und wie unter 2.2.6.5.1 von der Säule eluiert. Die dnTZ befanden sich im Durchfluss.

2.2.6.6 Proliferationstest

Bei diesem Test wird die Fähigkeit von Milz- oder Lymphknotenzellen untersucht, *in vitro* nach Stimulation mit ihrem spezifischen Antigen zu proliferieren.

Dazu wurden aus mit KLH immunisierten BALB/cJ-Mäusen die Milz- oder Lymphknotenzellen präpariert (siehe 2.2.6.3) und in einer 96-Loch-Flachbodenplatte kultiviert. Die Zellen wurden im Test mit verschiedenen Konzentrationen KLH stimuliert. Durch die vorhergehende *in-vivo*-Immunisierung war die Frequenz der antigenspezifischen T-Zellen erhöht, welche in der Kultur durch die Stimulation mit ihrem Antigen zur Proliferation angeregt wurden.

Die Proliferation wird durch die Zugabe von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen. Dieses wird am dritten Tag der Kultur appliziert. Während 16 Stunden Inkubation bei 37°C und 10% CO₂ wird das radioaktiv markierte Thymidin in die neu synthetisierte DNA sich teilender Zellen eingebaut. Die Radioaktivität kann dann mit einem Szintillationszähler gemessen werden.

Durchführung:

Nach Präparation von Milz- und Lymphknotenzellen (siehe 2.2.6.3) und Bestimmung der Lebendzellzahl (siehe 2.2.6.2) wurden die Zellen auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

In die ersten drei Vertiefungen einer 96-Loch-Flachbodenplatte wurden jeweils 200 µl der höchsten KLH-Konzentration in Kulturmedium (siehe 2.1.4.2) pipettiert. In alle anderen Vertiefungen wurden jeweils 100 µl Kulturmedium vorgelegt. Im Anschluss wurden aus den ersten drei Vertiefungen 100 µl KLH-Kulturmedium entnommen und in Triplikaten 1:2 über 7 Stufen titriert. In die letzten drei Vertiefungen wurde kein

KLH gegeben. Diese Medium-Kontrolle diente der Bestimmung der antigen-unspezifischen Proliferation. Danach wurde in jede Vertiefung 100 µl der Zellsuspension pipettiert. Es wurden je nach Test Zellzahlen zwischen $0,5 \times 10^5$ und 5×10^5 Zellen pro Vertiefung eingesetzt.

Nach dreitägiger Inkubation wurden die Zellen mit $0,25 \mu\text{Ci/Vertiefung } ^3\text{HTdR}$ versetzt. Nach weiterer Inkubation für 16 Stunden wurden die Kulturplatten bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Dadurch wurden die Zellmembranen aufgebrochen. Nach dem Auftauen der Zellkulturplatten wurde mit einem Zellerntegerät die DNA über einen Wasserstrom auf einen Glasfaserfilter gesaugt. Die Filter wurden anschließend in der Mikrowelle getrocknet. Danach wurden die getrockneten Filterblätter mit 10 ml einer Szintillationsflüssigkeit in eine Plastikhülle eingeschweißt und in Kassetten eingelegt. Der niedrigenergetische β -Strahler Thymidin wurde mit der Szintillationsflüssigkeit in seiner Strahlung verstärkt. Die Menge der eingebauten und verstärkten Radioaktivität wurde mit einem Szintillationsmessgerät ermittelt.

2.2.6.7 Proliferations-Suppressions-Test

Dieser Test diente der Untersuchung, ob Milzzellen von hochdosig (K100) immunisierten BALB/cJ-Mäusen die antigenspezifische Proliferation von Milzzellen aus niedrigdosig (K01) immunisierten BALB/cJ-Mäusen inhibieren können. Dazu wurden aus den unterschiedlich immunisierten Mäusen die Milzzellen präpariert (siehe 2.2.6.3.1) und in einer 96-Loch-Flachbodenplatte kokultiviert. Zu einer festgelegten Anzahl K01-Milzzellen wurden K100-Milzzellen oder zur Kontrolle Milzzellen aus naiven Mäusen in verschiedenen Zellzahlen titriert. Die Kokulturen wurden mit KLH verschiedenen in Konzentrationen stimuliert.

Die Proliferation wurde wie unter 2.2.6.6 beschrieben durch die Zugabe von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen. Es wurde am dritten Tag der Kokultur appliziert, über Nacht in die neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen eingebaut und mit einem Szintillationszähler am vierten Tag gemessen.

Durchführung:

Nach Präparation von Milzzellen (siehe 2.2.6.3.2) aus hochdosig (K100) und niedrigdosig (K01) immunisierten BALB/cJ-Mäusen und Bestimmung der

Lebendzellzahl (siehe 2.2.6.2) wurden die Zellen je nach Test auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

In die ersten drei Vertiefungen einer 96-Loch-Zellkulturplatte wurden jeweils 200 µl der K100-Milzzellsuspension pipettiert. Im Anschluss wurden daraus 100 µl entnommen und 1:2 in 100 µl Kulturmedium (siehe 2.1.4.2) seriell verdünnt. Danach wurden 50 µl einer Suspension von K01-Milzzellen je Vertiefung ausgeteilt. Die Zahl der K01-Milzzellen und die Startanzahl der K100-Zellen war je nach Test 5×10^4 bzw. $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung. Als Kontrolle dienten Triplikationsansätze nur mit der Startzellzahl oder der doppelten Zellzahl an K100- oder K01-Milzzellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen KLH-Konzentrationen stimuliert. KLH wurde in 50 µl Kulturmedium je Vertiefung mit dem Dispenser zur Kokultur gegeben.

Nach dreitägiger Inkubation wurden die Zellen mit 0,25 µCi/Vertiefung $^3\text{HTdR}$ inkubiert. Nach weiterer Inkubation für 16 Stunden wurden die Kulturplatten bei -20°C eingefroren. Die Prozedur der Messung der in die DNA eingebauten Radioaktivität wurde wie unter 2.2.6.6 beschrieben durchgeführt.

2.2.6.8 Bronchoalveoläre Spülung (BAL)

In den Asthmatherapieversuchen wurden die Versuchstiere nach der Sensibilisierung und verschiedenen therapeutischen Behandlungen intranasal mit OVA behandelt, um eine lokale Reaktion in der Lunge auszulösen. Zur Bestimmung der Zellinfiltration und der Zytokinproduktion in der Lunge wurde eine bronchoalveoläre Spülung durchgeführt. Die Versuchsmäuse wurden mit CO_2 getötet. Anschließend wurden der Brustkorb und die Trachea freipräpariert. Mit einer Kanüle wurde die Trachea parallel zu den Verknorpelungen perforiert. In diese Öffnung wurde ein Katheter geschoben. Mit einer 1 ml Einmalspitze wurde 1 ml eiskaltes 1 x PBS/10% FCS über den Katheter in die Lungen injiziert und im gleichen Zuge wieder abgesaugt, sofort in ein 15 ml-Polypropylen-Röhrchen gegeben und auf Eis gestellt. Nach der Volumenbestimmung wurde die Lungenspülung bei $300 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand (=BALF) abpipettiert und bis zur weiteren Untersuchung in einem Zytokin-ELISA (siehe 2.2.6.11) bei -20°C gelagert. Das aufgebrochene Zellsediment wurde in 500 µl 1 x PBS resuspendiert und bis zur Anfertigung von Zytospinpräparaten (siehe 2.2.6.9) auf Eis gelagert.

2.2.6.9 Anfertigung von Zytospinpräparaten

Ein Aliquot der in 2.2.6.8 erhaltenen Zellen der BAL wurde in Trypanblau verdünnt und die Lebendzellzahl bestimmt (siehe 2.2.6.2). Zu der Zellsuspension wurde 1 ml 1 x PBS gegeben und die Zellen wurden bei 300 x g und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellsediment in 100 µl 1 x PBS je 5×10^5 Zellen resuspendiert. Die Zellen wurden nun mit Hilfe einer speziellen Zytospin-Apparatur, bestehend aus Trichter, Klemme und Lochfilter, auf Objektträger zentrifugiert. Dazu wurden 100 µl Zellsuspension in den Trichter pipettiert und in einer Zytospin-Zentrifuge bei 500 Upm und mittlerer Beschleunigung fünf Minuten auf den in der Apparatur eingelegten Objektträger zentrifugiert. Die Objektträger wurden 20 Minuten lang luftgetrocknet und anschließend mit einem Diff-Quik[®]-Färbeset gefärbt. Dabei wurde ein Objektträger zehnmal in der vom Hersteller angegebenen Reihenfolge in jede der drei Lösungen getaucht. Danach wurden die Objektträger mit deionisiertem Wasser abgespült, um Färberückstände zu entfernen. Die Objektträger mit den angefärbten Zellen wurden luftgetrocknet und danach mit Entellan[®] und Deckgläschen eingedeckt.

2.2.6.10 Differenzierung der Zellen aus der Lungenspülung

Die Zellen auf den in 2.2.6.9 beschriebenen Zytospins wurden mit Hilfe einer an das Systemmikroskop Olympus BX50 angeschlossenen Digitalkamera und dem Computerprogramm analySIS charakterisiert und ausgezählt. Es wurden folgende Leukozytensubpopulationen anhand ihrer charakteristischen Morphologie (siehe Abb. 2.1) differenziert: Monozyten/Makrophagen, eosinophile und neutrophile Granulozyten und Lymphozyten. Während der bronchioalveolären Spülung kam es gelegentlich zu Einblutungen, weshalb auch Erythrozyten als nicht-immunologische Zellgruppe auf den Zytospins zu finden waren.

Die größten Zellen sind die Monozyten/Makrophagen (Abb. 2.1: 1), die in verschiedenen phänotypischen Ausprägungen vorkommen können. Charakteristisch ist ein violett gefärbter Zellkern umgeben von blauem Zytoplasma. Im Gegensatz dazu sind Lymphozyten (Abb. 2.1: 2) sehr kleine Zellen mit einem stark kondensierten dunkelblau gefärbten Chromatin. Das Zytoplasma ist kaum bis gar

nicht erkennbar. Besonders auffallend sind die eosinophilen Granulozyten (Abb. 2.1: 3) mit ihrem leuchtend rot gefärbten Zytoplasma und dem stark segmentierten blauen Kern. Die neutrophilen Granulozyten (Abb. 2.1: 4) unterscheiden sich von den Eosinophilen durch ein fast farbloses Zytoplasma. Auch der Neutrophilen-Kern ist blau gefärbt und segmentiert. Erythrozyten (Abb. 2.1: 5) sind mit einem Durchmesser von 7,5 µm die kleinsten Zellen in der BAL. Die kernlosen Zellen weisen eine gleichmäßige helle bräunliche bis rötliche Färbung auf. Von jedem Objektträger wurden bei einer 100-fachen Vergrößerung zehn repräsentative Fotos aufgenommen und die durchschnittlichen Zellzahlen von Monozyten/Makrophagen, Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Erythrozyten bestimmt.

Mit Hilfe der Volumina der bronchoalveolären Flüssigkeit und der zugehörigen Zellzahl wurden ebenfalls absolute Zellzahlen (Zellen/ml) errechnet.

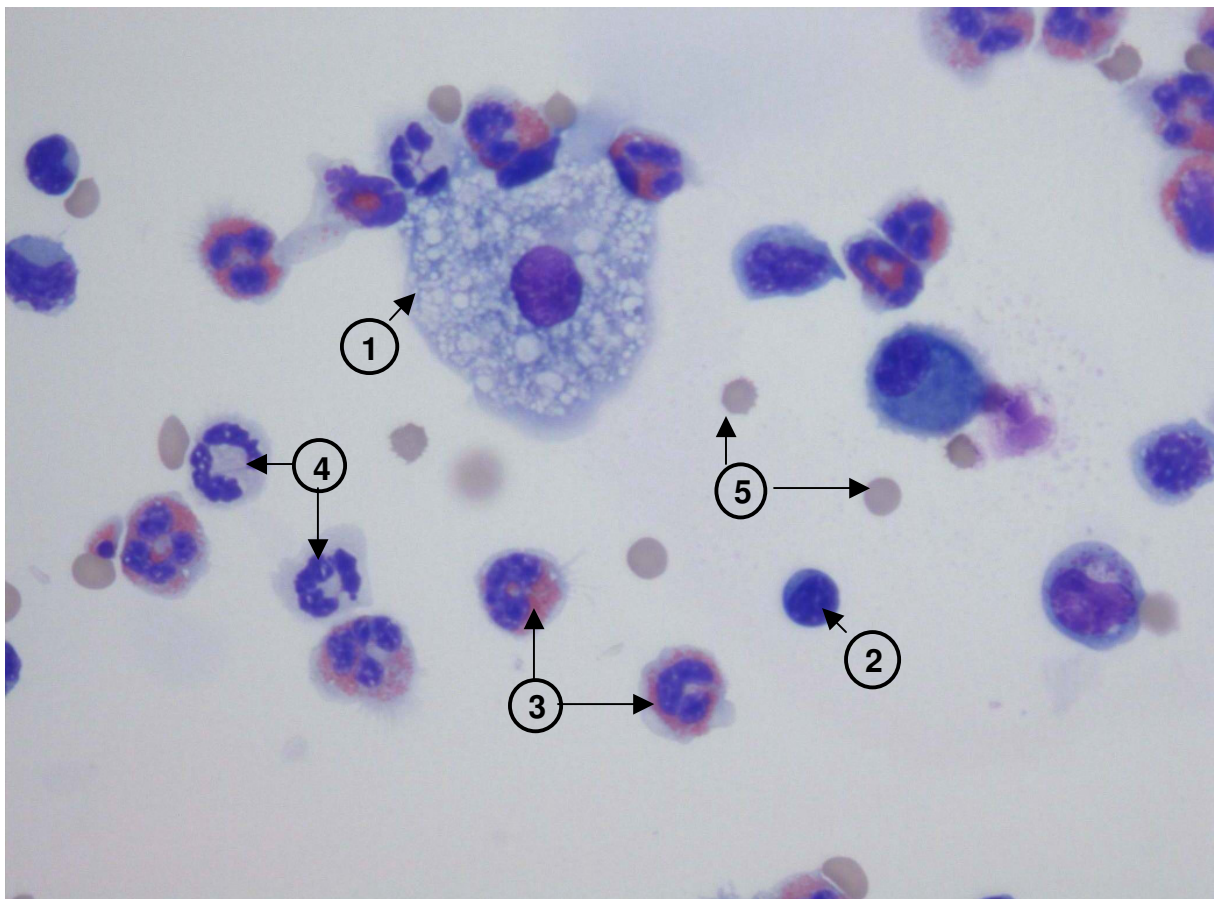


Abb. 2.1: Morphologie der Zellen in der BAL

Die Mikroskopaufnahme zeigt einen Ausschnitt aus einem DiffQuick-gefärbten Zytospin mit BAL-Zellen: Monozyten / Makrophagen (1), Lymphozyten (2), eosinophile Granulozyten (3), neutrophile Granulozyten (4), Erythrozyten (5).

2.2.6.11 ELISA zur Bestimmung von Zytokinen in der BALF und in Kulturüberständen

Zur quantitativen Bestimmung der in den Lymphknoten- und Milzzellkulturüberständen (siehe 2.2.6.4) sowie in der bronchoalveolären Flüssigkeit (siehe 2.2.6.8) enthaltenen Zytokine IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ und TGF- β wurde ein ELISA (**E**nzyme-**L**inked **I**mmunosorbent-**A**ssay) verwendet. Die Bestimmung des Zytokingehalts erfolgte über die (indirekte) Sandwich-ELISA-Methode, wobei die Überstände in einer Verdünnungsreihe mit an ELISA-Platten gebundenen zytokin-spezifischen „Capture-Antikörpern“ inkubiert wurden. Die festgehaltenen Zytokine wurden dann in einem weiteren Schritt durch zytokin-spezifische biotinylierte Detektions-Antikörper und anschließend durch streptavidin-konjugierte Meerrettich-Peroxidase gebunden, welche im letzten Schritt das farblose Substrat OPD (siehe 2.1.2) in ein photometrisch messbares Produkt umwandelt. Als Referenz wurden Standardlösungen der zu testenden Zytokine neben den Überständen mitgeführt.

Durchführung:

Die Adsorption der „Capture-Antikörper“ an ELISA-Platten erfolgte in 0,1 M NaHCO₃ (siehe 2.1.3.4) bzw. 1 x PBS (Antikörper-Konzentrationen und verwendete Puffer siehe 2.1.4.4) in einem Volumen von 50 μ l/Vertiefung über Nacht bei 4°C. Nach diesem Schritt wurden die Platten zweimal im ELISA-Washer mit Waschpuffer (siehe 2.1.4.4) gewaschen und gründlich ausgeklopft.

Um freie Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Platten nun mit 150 μ l/Vertiefung Blockierungspuffer (siehe 2.1.3.4) eine Stunde bei RT inkubiert. Zur Entfernung des Blockierungspuffers wurden die Platten gründlich ausgeklopft.

Zur Erstellung einer Verdünnungsreihe wurden der Zytokinstandard (mit bekannter Konzentration) und die Überstände (mit unbekanntem Zytokingehalt) seriell zweifach in 1 x PBS/1% BSA verdünnt (50 μ l/Vertiefung) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Platten zweimal mit Waschpuffer gewaschen und gründlich ausgeklopft.

Im Anschluss erfolgte die Bindung der biotinylierten Detektions-Antikörper (50 μ l/Vertiefung) während einer 60 minütigen Inkubationsphase bei 37°C bzw. 120 min bei RT (Konzentrationen und Inkubationsbedingungen siehe 2.1.5.4).

Nach nochmaligem Waschen (zweimal im ELISA-Washer mit ELISA-Waschpuffer) wurden 50 µl/Vertiefung Extravidin-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:2000 auf die Platten gegeben und 45 min bei RT inkubiert. Nach diesem letzten Schritt wurden die Mikrotiterplatten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und gründlich ausgeklopft. Zuletzt wurde der Test mit Hilfe des Substrats OPD entwickelt. Dazu wurde OPD in Substratpuffer (siehe 2.1.4.4) gelöst (OPD-Lösung: 1 mg/ml) und 30%iges Wasserstoffperoxid (1 µl pro ml OPD-Lösung) als Kosubstrat zur Substratlösung zugefügt. 50 µl der Substratlösung wurden anschließend in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert. Der Substratumsatz wurde durch eine Gelbfärbung angezeigt. Spätestens mit einer beginnenden Gelbfärbung in den Vertiefungen, in denen der Leerwert bestimmt wurde, musste der Test durch die Zugabe von 50 µl 1 M H₂SO₄ je Vertiefung abgestoppt werden, wodurch sich ein Farbumschlag von gelb zu orange ergab.

Die Extinktion wurde bei 490 nm im Spektralphotometer gemessen. Die Messwerte des Leerwerts wurden von den Extinktionswerten der Proben abgezogen. Mit den Extinktionswerten der Proben und des Standards wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Zur Errechnung der Zytokinkonzentrationen in den Proben wurden die Zytokinkonzentration des Standards und die Verdünnung der Probe bei einer optischen Dichte (OD) von 0,2 in Bezug gesetzt.

2.2.6.12 ELISA zur Bestimmung antigenspezifischer Immunglobuline in Immunsereen

Zum Nachweis der in den Seren immunisierter Mäuse enthaltenen antigenspezifischen Antikörper IgE, IgG1 und IgG2a wurde ein ELISA verwendet. Die Seren wurden in einer Verdünnungsreihe auf an ELISA-Platten gebundenes Antigen (KLH, OVA oder βGal) gegeben. Die festgehaltenen Antikörper konnten dann in einem weiteren Schritt durch isotypspezifische biotinylierte Detektions-Antikörper gegen IgE, IgG1 oder IgG2a nachgewiesen werden. An diese wurde streptavidin-konjugierte Meerrettich-Peroxidase gebunden, welche im letzten Schritt das farblose Substrat OPD (siehe 2.1.3) in ein photometrisch messbares Produkt umwandelt.

Durchführung:

Die Adsorption des Antigens (KLH, OVA oder β Gal) an ELISA-Platten erfolgte in 0,1 M NaHCO_3 (siehe 2.1.4.4) in einem Volumen von 100 μl /Vertiefung über Nacht bei 4°C. KLH und β Gal wurden mit 5 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt, OVA in einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$. Die Reihe 11 der ELISA-Platte wurde nicht mit Antigen beschichtet. Sie diente als Kontrolle für die Antigenspezifität der nachzuweisenden Antikörper. Nach der Inkubation wurden die Platten zweimal mit Waschpuffer (siehe 2.1.4.4) gewaschen und gründlich ausgeklopft.

Um freie Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Platten nun mit 150 μl /Vertiefung Blockierungspuffer (siehe 2.1.4.4) eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurden die Platten gründlich ausgeklopft.

Zur Erstellung einer Verdünnungsreihe wurden Seren seriell zweifach in 1 x PBS/1% BSA titriert (100 μl /Vertiefung). Die Platten wurden zwei Stunden bei RT inkubiert. Danach wurden sie zweimal mit Waschpuffer gewaschen und gründlich ausgeklopft.

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

Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 100 μl /Vertiefung Extravidin-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:2000 auf die Platten gegeben und 45 min bei RT inkubiert. Nach diesem letzten Schritt wurden die Mikrotiterplatten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und gründlich ausgeklopft.

Die Entwicklung und Messung des Tests erfolgte wie unter 2.2.6.11 beschrieben, jedoch in einem Pipettiervolumen von 100 μl pro Vertiefung.

Die Messwerte des Leerwerts wurden von den Extinktionswerten der Serumproben abgezogen. Mit den Extinktionswerten der Proben wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Als Ergebnis erhielt man die antigen-

spezifischen Antikörpertiter bei einer optischen Dichte (OD) von 0,2. Die antigen-spezifischen Antikörpertiter der verschiedenen Seren bei $OD_{0,2}$, die zusammen auf einer Platte gemessen wurden, wurden nun direkt miteinander verglichen.

2.2.6.13 RBL-Test

Der RBL-Test ist eine Methode zum Nachweis von funktionell aktiven antigenspezifischen IgE-Antikörpern. Die Ratten-Basophilen-Zelllinie RBL-2H3 wird hierbei mit verschiedenen Mausseren (von immunisierten und naiven Mäusen) inkubiert. Die Hälfte der serumbehandelten Zellkultur wird mit dem spezifischen Antigen stimuliert, die andere Hälfte bleibt unstimuliert. Während der Stimulationsphase schütten RBL-2H3-Zellen, die mit Seren inkubiert wurden, welche antigenspezifisches IgE enthalten, das Enzym β -Hexosaminidase aus. Die Menge des sezernierten Enzyms ist abhängig vom antigenspezifischen IgE-Gehalt der Seren. Eine Zellkultur, die nicht mit Serum behandelt wurde, wird mit den unspezifischen Stimulatoren A23187 und PMA stimuliert. Diese unspezifisch stimulierten RBL-2H3-Zellen schütten große Mengen β -Hexosaminidase aus und dienen als Positivkontrolle. Nicht stimulierte serumbehandelte RBL-2H3-Zellen sezernieren kein oder nur wenig Enzym. Nach der 45 minütigen Stimulationsphase werden die Überstände von den Zellkulturen genommen und anschließend die Zellen mit dem Detergens Triton-X lysiert. Der β -Hexosaminidasegehalt in den Überständen und den Lysaten wird mit Hilfe des Substrats pNAG nachgewiesen. Die von der β -Hexosaminidase umgesetzte Substratmenge wird nach Zugabe von Glycinpuffer durch eine Gelbfärbung angezeigt. Vergleicht man die β -Hexosaminidasemenge in den Überständen und den Lysaten der verschiedenen Proben, kann man den relativen Gehalt funktionellen antigenspezifischen IgEs in den verschiedenen Seren ermitteln.

Vorbereitung:

Vier Tage vor dem Test wurden drei Tropfen RBL-2H3 Zellen aus der Erhaltungskultur (siehe 2.2.6.16.1) in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 30 ml RBL-Kulturmedium (siehe 2.1.4.2) überführt. Nach 72 Stunden Kultur bei 37°C und 10% CO₂ (am Vortag des Tests) war der Flaschenboden mit einem dichten Zellrasen bewachsen. Die Zellen wurden wie unter 2.2.6.16.1 beschrieben mit

0,05%Trypsin/2 mM EDTA geerntet. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 10 ml RBL-Kulturmedium aufgenommen und die Lebendzellzahl bestimmt (siehe 2.2.6.2). Die Zellzahl wurde auf 6×10^5 Zellen/ml eingestellt und dann wurden 3×10^4 Zellen (50 μ l) pro Vertiefung auf eine 96-Loch-Flachbodenplatte ausgeteilt. Die ausgesäten RBL-2H3-Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert.

Durchführung:

Am Versuchstag wurden zuerst die zu testenden Seren aufgetaut und zehnfach konzentriert gegenüber der gewünschten Endkonzentration in RBL-Kulturmedium verdünnt. Dann wurden entsprechend der Plattenbelegung je Vertiefung 5 μ l Serumverdünnung zu den Zellen gegeben (je Serum zwei Triplikate) und für weitere zwei Stunden bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert.

In der Zwischenzeit wurden TYRODES-Puffer (2.1.4.1), 1,5-prozentiges Triton X-100 (verdünnt in TYRODES-Puffer), die Stimulatoren KLH (1,5 μ g/ml in TYRODES-Puffer) sowie die Positivkontrolle [75 μ l A23187 (= 7,5 μ M) und 46,2 μ l PMA (= 150 nM) in TYRODES-Puffer] und die Testplatten vorbereitet.

Nach der Inkubation der Seren wurde die Platte zweimal mit 150 μ l TYRODES-Puffer pro Vertiefung mit Hilfe einer Mehrkanalpipette gewaschen. Anschließend wurden die Stimulatoren ausgeteilt. In je ein Triplikat pro Serum wurden 100 μ l KLH (Endkonzentration 1 μ g/ml) pro Vertiefung pipettiert. Das zweite Triplikat wurde nicht stimuliert, die Vertiefungen wurden mit je 100 μ l RBL-Kulturmedium gefüllt. In die Positivkontrolle wurden 100 μ l der A23187/PMA-Mischung pro Vertiefung pipettiert. Zur Stimulation wurden die Zellen weitere 45 min bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Während dieser Zeit setzten RBL-2H3-Zellen, die mit A23187/PMA oder IgE-haltigem Serum und KLH aktiviert worden waren das Enzym β -Hexosaminidase frei. Unstimulierte Zellen und Zellen, die mit naivem oder IgE-armem Serum inkubiert worden waren, setzten kein oder entsprechend weniger Enzym frei.

Nach Ende der Stimulationszeit wurden 100 μ l Kulturüberstand pro Vertiefung entnommen, die Triplikate vereinigt und bis zum β -Hexosaminidase-Nachweis aufbewahrt.

Die Platte wurde anschließend zweimal mit 150 μ l TYRODES-Puffer pro Vertiefung mit Hilfe einer Mehrkanalpipette gewaschen. Dann wurden 100 μ l 1,5-prozentiges Triton X-100 in TYRODES-Puffer pro Vertiefung zu den Zellen pipettiert und 30 min bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Durch die Inkubation mit dem Detergenz Triton X

wurden die Zellen lysiert. Von diesen Lysaten wurden ebenfalls wieder 100 µl pro Vertiefung entnommen und die Triplikate vereinigt.

Nun erfolgte der Nachweis der β -Hexosaminidase in den Überständen und den Lysaten. Dazu wurden in die zuvor beschrifteten 96-Loch-Flachboden-Nachweisplatten 75 µl Überstand bzw. Lysat (Duplikate) pipettiert. In die folgenden zwei Vertiefungen wurden 50 µl TYRODES-Puffer vorgelegt. Aus der ersten Vertiefung wurden nun 25 µl Überstand bzw. Lysat entnommen und seriell dreifach verdünnt. Den Leerwert bildeten sechs Vertiefungen mit je 50 µl TYRODES-Puffer.

In sämtliche Vertiefungen wurden nun je 50 µl pNAG (1 mM in 0,1 M tri-Na-Citratpuffer, leicht angewärmt) pipettiert und 60 min bei 37 °C inkubiert.

Danach wurden je Vertiefung 150 µl 0,2 M Glycinpuffer zugegeben, wodurch es zu einem Farbumschlag entsprechend der β -Hexosaminidase-Menge von Farblos nach Gelb kam. Die Extinktion der Proben wurde bei 405 nm photometrisch gemessen.

Mit den Extinktionswerten der Überstände und der Lysate wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt, mit deren Hilfe der prozentuale Anteil der β -Hexosaminidase in den Überständen gemessen an der Gesamtmenge des Enzyms in Überständen und Lysaten errechnet wurde.

2.2.6.14 CTL-ELISpot

Der CTL-„Enzyme-Linked-ImmunoSpot-assay“ (CTL-ELISpot-Test) ist eine Methode zur Ermittlung der Anzahl der IFN- γ produzierenden CD8⁺ T-Effektorzellen. Dazu wird zunächst eine mit einer Nitrozellulosemembran ausgekleidete 96-Loch-Platte mit einem unmarkierten sterilen anti-IFN- γ -Antikörper beschichtet. Nach der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit Kulturmedium (siehe 2.1.4.2) wird die zu untersuchende Zellsuspension auf die Platte aufgebracht und durch die Zugabe eines MHC I-restringierten Peptids stimuliert, was zu einer Zytokinproduktion in den antigenspezifischen CD8⁺ T-Effektorzellen führt. Im Verlauf einer Kulturphase von 22 Stunden wird das freigesetzte IFN- γ von den an die Nitrozellulosemembran gekoppelten Antikörpern gebunden. An den Stellen, an denen sich IFN- γ -produzierende Zellen befinden, wird vermehrt IFN- γ an den Plattenboden gebunden. Zur Detektion wird nach dem Auswaschen der Zellen zunächst ein biotinylierter Detektionsantikörper gegen IFN- γ in die Vertiefungen pipettiert und in einem zweiten

Schritt die Extravidin-Peroxidase aufgebracht. Das Enzym bindet über Streptavidin an den biotinylierten Detektionsantikörper und setzt das anschließend zugegebene Substrat AEC mit Hilfe von H_2O_2 zu einem unlöslichen roten Farbkomplex um, der auf den hellen Nitrozelluloseböden als dunkler rundlicher Fleck sichtbar wird. Diese „Spots“ konnten dann im ELISPOT-Zählgerät mit Hilfe festgelegter Kriterien zu deren Identifikation (Größe, Intensität und Aussehen) ausgewertet werden.

Durchführung:

Die Vertiefungen der mit einer Nitrozellulosemembran ausgekleideten 96-Loch-Mikrotiterplatte (Millipore) wurden mit 50 μl unmarkiertem Ratte-anti-Maus-IFN- γ -Antikörper in 1 x PBS in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ beschichtet und über Nacht bei 4°C gehalten. Anschließend wurde die Platte zweimal mit jeweils 100 μl pro Vertiefung sterilem 1 x PBS gewaschen und dann die freien Bindungsstellen mit 200 μl Kulturmedium (siehe 2.1.4.2) für ein bis zwei Stunden bei 37°C blockiert. Danach wurde das Medium wieder entfernt. Die Milzzellen wurden zu 1×10^6 bzw. 2×10^5 Zellen pro Vertiefung auf die Platte gegeben. Es wurden pro Gruppe Quadruplikate mit und ohne Zusatz des MHC I-restringierten βGal -Peptids TPHPARIGL (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) angesetzt. Zu allen Ansätzen wurden 250 U/ml IL-2 pipettiert. Das Endvolumen der Kultur wurde auf 200 μl eingestellt. Nach 22 Stunden Kultur bei 37°C und 10% CO_2 wurde die Platte zweimal im ELISA-Washer (2.1.1) mit Waschpuffer (2.1.4.4) gewaschen und gründlich ausgeklopft. Die Detektion des von den Zellen sezernierten und von den Antikörpern gebundenen IFN- γ erfolgte durch die Zugabe von 50 μl biotinyliertem Detektionsantikörper AN18.17.24 je Vertiefung in einer Verdünnung von 1:500 in 1 x PBS/1% BSA. Nach einer einstündigen Inkubationsphase bei 37°C wurde die Platte erneut zweimal gewaschen und ausgeklopft. Dann wurden 50 μl Extravidin-Peroxidase (1:1000 in 1 x PBS/1% BSA) aufgetragen. Es folgte eine weitere Stunde Inkubation bei 37°C. Währenddessen wurde die zur Entwicklung des Tests benötigte AEC-Lösung angesetzt. Das Substrat AEC wurde als Tablette in 2,5 ml DMF gelöst. Anschließend wurden 525 μl dieser Lösung in 10 ml 0,1 M Natrium-Acetat-Puffer aufgenommen und der Ansatz für 30 Minuten auf dem Magnetrührer gerührt. Nach beendeter Inkubation wurde die ELISpot-Platte dreimal im ELISA-Washer mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Die AEC Lösung wurde durch einen 0,45 μm Filter filtriert und mit 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ H_2O_2 versetzt. In jede der Vertiefungen wurden 50 μl Substratlösung

pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von fünf bis fünfzehn Minuten waren rote Flecken zu erkennen, woraufhin die Substratlösung durch Ausschlagen der Platte entfernt wurde. Die Platte wurde über Nacht getrocknet und die Auswertung erfolgte mit der ELISpot-Auswerteeinheit unter Berücksichtigung festgelegter Kriterien zur Identifikation der „Spots“ wie Größe, Intensität und Aussehen.

2.2.6.15 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Erfassung bestimmter oberflächenproteintragender Zellen. Dazu werden Zelloberflächenmoleküle mit epitopspezifischen Antikörpern markiert. Entweder sind diese Primärantikörper bereits fluoreszenzmarkiert (direkte Antigen-Antikörper-Färbung) oder man bindet in einem zweiten Schritt einen mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper an den unmarkierten Primärantikörper (indirekte Antigen-Antikörper-Färbung) bzw. einen Streptavidin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff an einen biotinylierten Primärantikörper. Um die nicht spezifischen Bindungen eines Antikörperisotypes zu bestimmen, wird eine Isotypkontrolle bei der Färbung mit Antikörpern mitgeführt. Dabei erfolgt eine Inkubation mit einem Antikörper derselben Spezies und desselben Isotyps.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden an einem FACScan (fluorescence-activated cell scanner) durchgeführt. Das in einem Probenröhrchen an das FACS-Gerät angeschlossene Zellgemisch wird durch Luftdruck über eine in der Zellsuspension befindliche Einspritznadel ins Flüssigkeitssystem gepresst. In dem Gerät werden die markierten Zellen in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt an einem Argon-Laserstrahl vorbeigeleitet. Nachgeschaltete Detektoren messen die Fluoreszenz und die Streuung und Beugung des Laserstrahls. Über die Lichtstreuung (SSC: Side Scatter) kann man Aussagen über die Granularität der Zellen treffen, durch die Beugung des Lichts (FSC: Forward Scatter) erfährt man ihre Größe. Mit diesen beiden Parametern lassen sich verschiedene Zellpopulationen voneinander abgrenzen sowie tote von lebenden Zellen unterscheiden. Mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper kann man die Verteilung und Expressionsstärke von verschiedenen Oberflächenantigenen auf den untersuchten Zellen nachweisen. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden bei 488 nm angeregt und

emittieren Licht verschiedener Wellenlängen (Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) haben ihre Emissionsmaxima bei 519 bzw. 578 nm). Diese kann man anhand nachgeschalteter Filtersysteme unterscheiden und somit bis zu drei Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig detektieren.

Durchführung:

Mit der FACS-Analyse wurde die Expression diverser Treg-assoziiierter Oberflächenproteine auf Milzzellen aus K01- und K100-Mäusen untersucht. Außerdem wurde die Reinheit isolierter Milzzellpopulationen nach MACS-Aufreinigung (siehe 2.2.6.5) überprüft. Die in FACS-Medium (siehe 2.1.4.1) resuspendierten Zellen wurden je Versuchsgruppe zu 2 bis 5×10^5 Zellen je FACS-Röhrchen aufgeteilt. Es wurde 1 ml FACS-Medium in jedes Röhrchen gegeben und diese dann bei $300 \times g$ und 4°C zehn Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt.

Die gesamte Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurde auf Eis durchgeführt, um eine antikörperaktivierte Endozytose oder „Shedding“ von Oberflächenmolekülen zu vermeiden. Außerdem wurden die Proben während und nach der Färbung im Dunkeln gehalten, um die Fluoreszenzfarbstoffe vor dem Ausbleichen zu schützen. Die unterschiedlichen Färbungen erfolgten, wie nachfolgend unter 1) – 3) beschrieben. Alle für die FACS-Färbung verwendeten Antikörper sind unter 2.1.5.2 und 2.1.5.3 aufgelistet.

Bis zur FACS-Messung wurden die fixierten Proben bei 4°C im Dunkeln zwischengelagert. Damit nur intakte Zellen in die Auswertung aufgenommen wurden, wurden Zellaggregate und tote Zellen über Größe und Granularität mit der FACS-Gerät-Software aussortiert. Die Lymphozyten wurden eingrenzt. Von den Zellen in diesem Lymphozytenareal wurden mindestens 10 000 Ereignisse je Probe gemessen und mit dem CellQuestTM-Programm des Gerätes analysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm WinMDI 2.8.

1) Nachweis von CD4, CD25 und CTLA-4 bzw. GITR

Bei der Färbung von CTLA-4 oder GITR war es nötig, freie Fc-Rezeptoren auf den Zellen vorher abzusättigen. Dazu wurden die Zellen zunächst mit $25 \mu\text{l}$ 2.4.G2-Sup (anti-Maus Fc γ II/III) je Röhrchen durch Vortexen vermischt und dann 15 min bei RT

inkubiert. Zwischendurch wurde noch einmal gemischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im 2.4.G2-Sup und so eine gute Absättigung aller freien Bindungsstellen zu ermöglichen. Nach der Inkubation wurden dem Gemisch je Röhrchen 10 µl anti-CTLA-4-FITC oder anti-GITR-FITC zugefügt und die Suspension gemischt. Die Inkubation erfolgte 15 min bei 4°C. Dabei wurde zwischendurch noch einmal gemischt. Zuletzt wurden dem Gemisch je Röhrchen 15 µl Antikörper-„Cocktail“, bestehend aus 1 µl anti-CD4-Cy5 und 0,5 µl anti-CD25-PE sowie 13,5 µl FACS-Medium zugefügt. Vor und während der 20-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Gemisch gemischt. Nach diesem letzten Schritt wurden die Proben in 1 ml FACS-Medium je Röhrchen gewaschen und zehn Minuten bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen in 400 µl Fixierungslösung (siehe 2.1.4.1) fixiert.

2) Nachweis von CD28 und CD8

Zuerst wurden die Zellen mit 1 µl anti-CD28-Biotin und 49 µl FACS-Medium je Röhrchen gemischt. Die Inkubation erfolgte für 20 min auf Eis. Zwischendurch wurde noch einmal gemischt. Danach wurden die Proben in 1 ml FACS-Medium je Röhrchen gewaschen und zehn Minuten bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit 1 µl SA-DTAF, 1 µl anti-CD8-Cy5 und 48 µl FACS-Medium gemischt. Das Gemisch wurde weitere 20 min auf Eis inkubiert und dabei zwischendurch einmal gemischt. Zuletzt wurden die Proben in 1 ml FACS-Medium je Röhrchen gewaschen und zehn Minuten bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen in 500 µl Fixierungslösung fixiert.

3) Einfach- oder Mehrfachfärbungen mit direkt fluoreszenzmarkierten Antikörpern sowie Isotypkontrollen

Im Fall der Färbung ausschließlich mit direkt fluoreszenzmarkierten Primärantikörpern und Isotypkontrollantikörpern wurden die Zellen in einem Schritt gefärbt. Es wurde ein Antikörper-„Cocktail“ bestehend aus 1-2 µl je Antikörper und FACS-Medium in einem Volumen von 50 µl je Röhrchen auf die Zellen pipettiert. Vor und während der 20-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Gemisch gemischt.

Danach wurden die Proben in 1 ml FACS-Medium je Röhrchen gewaschen und zehn Minuten bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen in 500 µl Fixierungslösung fixiert.

2.2.7 Grafik und Statistik

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

2.3 Molekularbiologische Methoden

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

2.3.1 Herstellung von chemokompetenten TOP10-Zellen

Zunächst wurden TOP10-Zellen (2.1.13) über Nacht in 5 ml LB-Medium (2.1.4.3) bei 37°C und 180 Upm im Schüttelinkubator kultiviert. Diese Kultur wurde am nächsten Tag mit 95 ml LB-Medium verdünnt und weitere 3 – 4 Stunden bei 37°C und 180 Upm im Schüttelinkubator kultiviert. Wenn die Bakterienkultur eine mittlere logarithmische Wachstumsphase erreicht hatte (bei $OD_{600} \sim 0,4$), wurde sie 15 Minuten auf Eis gestellt und danach bei 2000 x g und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment in 15 ml RF1-Salzpuffer (2.1.4.1) resuspendiert. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut bei 2000 x g und 4°C 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 4 ml RF2-Salzpuffer (2.1.4.1) resuspendiert. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation auf Eis war die Herstellung der

chemokompetenten TOP10 abgeschlossen und sie konnten aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden.

2.3.2 Herstellung von elektrokompetenten TOP10-Zellen

Zunächst wurden TOP10-Zellen (2.1.13) über Nacht in 50 ml LB-Medium (2.1.4.3) bei 37°C und 180 Upm im Schüttelinkubator kultiviert. Diese Kultur wurde am nächsten Tag mit 950 ml LB-Medium verdünnt und weitere 2 bis 3 Stunden bei 37°C und 180 Upm im Schüttelinkubator kultiviert. Wenn die Bakterienkultur eine mittlere logarithmische Wachstumsphase erreicht hatte (bei $\text{OD}_{600} \sim 0,4$), wurde sie 10 Minuten auf Eis gestellt und danach bei $2000 \times g$ und 4°C 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment in 500 ml eisgekühltem destillierten Wasser resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde bei $2000 \times g$ und 4°C 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment erneut in 500 ml eisgekühltem destillierten Wasser resuspendiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und $4000 \times g$ wurde das Bakterienpellet in 4 ml eiskalter zehn-prozentiger Glycerinlösung resuspendiert. 100 μl -Aliquote der fertigen elektrokompetenten Top10 wurden bei -80°C gelagert.

2.3.3 Transformation und Kultivierung von Bakterien

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

2.3.3.1 Transformation von chemokompetenten TOP10-Zellen

Bei der chemischen Transformationsmethode für *Escherichia coli* bedingt ein Temperaturschock die DNA-Aufnahme in die prokaryotischen Zellen, wobei der eigentliche Einschleusungsmechanismus unbekannt ist. Im Rahmen der Bakterientransformation mit einem Expressionsplasmid wurden 50 µl chemokompetenter TOP10-Bakteriensuspension (2.1.13) mit etwa 1 µg DNA resuspendiert und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gemisch für zwei Minuten in ein 42°C temperiertes Wasserbad gehalten. Dieser Hitzeschock ermöglichte die Aufnahme der DNA in die Bakterien. Anschließend wurde der Transformationsansatz für fünf Minuten auf Eis gestellt und danach in ein mit 1 ml LB-Medium gefülltes 15 ml-Probenröhrchen überführt. Dieser Ansatz wurde als Vorkultur für eine Stunde im Inkubator bei 37°C und 300 Upm inkubiert. Danach wurde eine weiterführende Kultur dieser Bakterien in 250 ml Selektionsmedium (LB-Medium versetzt mit Ampicillin oder Kanamycin) angesetzt, die über Nacht bei 37°C und 300 Upm inkubiert wurde. Die transformierten Bakterien exprimierten das plasmidkodierte Resistenzgen und konnten sich aufgrund dessen in dem Selektionsmedium vermehren.

2.3.3.2 Transformation von elektrokompetenten TOP10-Zellen

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

Dazu wurden 50 µl elektrokompetenter TOP10-Bakteriensuspension mit etwa 1 µg DNA resuspendiert und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß für eine Minute auf Eis gehalten. Dann wurde der Transformationsansatz in eine eisgekühlte Küvette pipettiert und die elektrokompetenten TOP10-Zellen bei 2,1 kV, 200 Ω und 25 µF im Elektroporator transformiert. Danach wurden die Bakterien sofort in 250 µl 37°C warmes LB-Medium aufgenommen und in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt. Dieser Ansatz wurde als Vorkultur für eine Stunde im Inkubator bei 37°C und 300 Upm inkubiert. Danach wurden die Bakterien entweder auf Selektions-Agarplatten ausplattiert (50-200 µl Bakteriensuspension pro Platte) und über Nacht

im Brutschrank bei 37°C inkubiert oder es wurde eine weiterführende Kultur dieser Bakterien in 250 ml Selektionsmedium (LB-Medium versetzt mit Ampicillin oder Kanamycin) angesetzt, die über Nacht bei 37°C und 300 Upm inkubiert wurde. Die erfolgreich transformierten Bakterien exprimierten das plasmidkodierte Resistenzgen und konnten aufgrund dessen auf den Selektions-Agarplatten Kolonien bilden oder sich in dem Selektionsmedium vermehren.

2.3.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA

2.3.4.1 Schnelle Aufreinigung von Plasmid-DNA

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

200 µl der Über-Nacht-Bakterienkultur wurden dann in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und für zwei Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Bakteriensediment wurde mit 25 µl Bromphenolblau und 10 µl PCI durch Vortexen gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Dabei wurden die Bakterien lysiert. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 11000 x g hatte sich eine farblose Phase (PCI-haltig) abgesetzt und eine blaue wässrige Phase darüber gebildet, die die Nukleinsäuren enthielt. 10 µl dieser DNA-haltigen Phase wurde nun auf ein Agarosegel aufgetragen und einer Gelelektrophorese (2.3.8) unterzogen. Man konnte nun auf dem Gel unterschiedlich große DNA-Plasmide unterscheiden und eine Vorauswahl treffen, welche Klone wahrscheinlich ein intaktes Vektor-Insert-Konstrukt in sich trugen und somit weiter aufgereinigt (2.3.4.2: Isopropanol-Minipräparation oder 2.3.4.3: Aufreinigung mit dem Plasmid Mini Kit von Qiagen) und Restriktionskontrollen unterzogen werden konnten.

2.3.4.2 Isopropanol-Minipräparation von Plasmid-DNA

1,5 ml einer Über-Nacht-Bakterienkultur wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und 2 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 100 µl Puffer P1 (Qiagen) resuspendiert und dann

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

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

Eine Über-Nacht-Bakterienkultur wurde bei 2000 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 250 µl RNase-haltigem Puffer P1 resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Zur Suspension wurden nun 250 µl Lysepuffer P2 (enthält Natronlauge und SDS für eine alkalische Lyse) gegeben. Zur vollständigen Lyse der Bakterien wurde die Suspension invertiert und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wurden nun 350 µl essigsäure-haltiger Puffer N3 zugegeben und gut geschüttelt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 11000 x g hatten sich die Zellreste abgesetzt. Der plasmidhaltige Überstand wurde in eine Mini-Zentrifugationssäule überführt. Diese wurde für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säulenmembran wurde nun mit 750 µl Entsalzungspuffer PE behandelt. Nach einer Minute Inkubation bei RT wurde die Säule erneut für 30 Sekunden bei 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der Zentrifugationsvorgang wurde wiederholt, um letzte Pufferreste zu entfernen. Nun wurde die Säule in ein neues

1,5 ml-Eppendorfgefäß gesteckt und 50 µl deionisiertes Wasser direkt auf die Membran gegeben. Nach einer Minute Inkubation bei RT wurde die Säule für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA eluiert wurde. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.3.5) und die Plasmid-DNA bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

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

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

Die Bakteriensuspension wurde nun in einen 500 ml-Zentrifugenbecher gefüllt und für 15 Minuten bei 4000 Upm und 4 °C in der Sorvall-Ultrazentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 10 ml RNase-haltigem Puffer P1 resuspendiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zur alkalischen Lyse der Bakterien wurden 10 ml NaOH- und SDS-haltiger Lysepuffer P2 zugegeben und unter ständigem Invertieren fünf Minuten bei RT inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch die Zugabe von 10 ml essigsäure-haltigen Puffer P3, wobei die Mischung gut geschüttelt wurde. Die lysierten Bakterien wurden nun 15 Minuten bei 4 °C und 2000 x g zentrifugiert. Dabei setzten sich Zellreste am Boden des Röhrchens und als Schicht über dem geklärten Lysat ab. Die obere Schicht wurde mit einer Einwegpipettenspitze entfernt. Das geklärte Lysat konnte nun in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 6 ml LPS-Entfernungspuffer gemischt werden. Diese Mischung wurde erst 10 Minuten auf Eis und dann weitere 10 Minuten im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Dann wurde 5 Minuten bei RT und 2000 x g zentrifugiert, wobei sich die LPS-haltige blaue Phase absetzte. Die klare obere Phase wurde in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nun wurde eine Midi-Säule in einem Ständer in eine Plastikwanne gestellt und mit 4 ml Puffer QBT

äquiliibriert. Dann wurde das geklärte Lysat nach und nach auf die Säule geladen. Die Säule wurde anschließend dreimal mit jeweils ca. 10 ml Waschpuffer QC gewaschen. Der Durchfluss in der Wanne wurde verworfen und die Säule mit Adapterringen auf ein mit 12,5 ml Isopropanol gefülltes 50 ml Zentrifugenröhrchen gestellt. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden zweimal 7,5 ml Elutionspuffer QF auf die Säule gegeben und die eluierte Plasmid-DNA tropfte in den Isopropanol. Die DNA im Eluat wurde nun durch 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 2000 x g gefällt. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierte DNA in 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter fünf-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 2000 x g wurde der Ethanol vorsichtig abpipettiert und das DNA-Pellet luftgetrocknet. Die Plasmid-DNA wurde zuletzt in 100-200 µl endotoxinfreiem Aqua dest. gelöst, die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 2.3.5) und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.3.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

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

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

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

Durchführung:

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

2.3.6 Restriktion von Plasmid-DNA

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

Diese Methode kann man zum einen nutzen, um einen Expressionsvektor in der „Multiple Cloning Site“ zu schneiden und ein passendes Insekt einzuligieren. Außerdem dient die Restriktionsverdauung der Kontrolle von Plasmiden. Nach einer erfolgreichen Plasmid-Isolierung aus Bakterien wurden Restriktionsverdauungen der Plasmide mit geeigneten Restriktionsenzymen angesetzt, die spezifische Fragmente aus Plasmid-Vektoren herausschnitten. Die entstandenen Fragmente wurden nachfolgend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das Molekulargewicht bestimmt.

2.3.6.1 Restriktionskontrollen

Für die Herstellung von Restriktionskontrollen wurden 500 ng – 1 µg DNA mit 0,5-1 µl Restriktionsendonuklease (10 U/µl), 2 µl 10 x Restriktionspuffer und deionisiertem Wasser in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt. Wurde ein Enzym verwendet,

das Sternaktivität aufwies, wurden außerdem 0,2 µl BSA (100 x konzentriert) zum Ansatz pipettiert. Der Restriktionsansatz wurde für mindestens zwei Stunden oder über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach der fertigen Inkubation wurde der Restriktionsansatz auf einem 0,8-1-gewichtisprozentigen Agarosegel aufgetragen (siehe 2.3.8).

2.3.6.2 Restriktion zu Klonierungszwecken

Im Rahmen der Klonierungen wurden die „open reading frames“ (ORF) verschiedener Gene in den Expressionsvektor pCi kloniert. Dazu mussten die gewünschten Mini-Gene aus vorliegenden Plasmiden ausgeschnitten und in den linearisierten Zielvektor ligiert werden. Um das DNA-Fragment mit dem Zielgen vom Plasmidvektor zu trennen, mussten die Restriktionsfragmente über eine Gelelektrophorese

(siehe 2.3.8) aufgetrennt und das gewünschte Fragment aus dem Gel eluiert werden (siehe 2.3.9). In diesem Fall mussten größere Mengen DNA restringiert werden, um genug Material für die Weiterverarbeitung zu haben. Bis zu 10 µg DNA wurden mit bis zu 2 µl Restriktionsendonuklease, 1 µl BSA, bis zu 5 µl 10 x Restriktionspuffer und deionisiertem Wasser in einem Gesamtvolumen von bis zu 50 µl gemischt. Die Restriktion wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, um einen vollständigen Verdau der DNA zu ermöglichen. Im Anschluss wurden, wie oben erwähnt, die Fragmente über eine Gelelektrophorese getrennt und das Zielfragment eluiert. Bei einer Linearisierung wurde nur ein Aliquot des Restriktionsansatzes (1 µg DNA) auf ein Agarosegel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die Linearisierung erfolgreich war.

2.3.6.3 Dephosphorylierung zur Stabilisierung restringierter Plasmide

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

2.3.7 Aufreinigung von restringierter DNA

Zum Restriktionsansatz wurde das fünffache Volumen DNA-Bindepuffer PB (Qiagen) pipettiert. Dann wurde die Mischung auf eine Zentrifugationssäule (Plasmid Mini Kit, Qiagen) gegeben und für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde anschließend mit 750 µl Waschpuffer PE (Plasmid Mini Kit, Qiagen) beladen und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Säule für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und der Zentrifugationsvorgang mit der trockenen Säule wiederholt. Nun wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt und zur Elution der DNA 40 µl deionisiertes Wasser direkt auf den Filter pipettiert. Nach einer Minute Inkubation wurde erneut bei 11000 x g zentrifugiert. Das Eluat mit der aufgereinigten restringierten DNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis von DNA-Fragmenten bedient man sich der Methode der Gelelektrophorese. DNA-Proben werden mit einem dichteerhöhenden sucrose- und bromphenolblauhaltigen Puffer gemischt, in die Vertiefungen einer festen Gelmatrix aus Agarose und TBE-Puffer pipettiert und in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt. Die DNA wandert aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrates bei neutralem pH-Wert in diesem Feld von der Anode zur Kathode. Die Laufgeschwindigkeit der DNA-Fragmente im Agarosegel hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab: erstens von der Agarosekonzentration des Gels (je höher die eingesetzte Menge an Agarose, desto feinmaschiger ist das als Molekularsieb fungierende Polymer), zweitens von der elektrischen Spannung des Gels (die Laufgeschwindigkeit steigt proportional zur Spannung), drittens der Größe der DNA (kleine Fragmente wandern schneller als große) und viertens von der Konformation der DNA. So zeigen unverdaute Plasmide bei gelelektrophoretischer Auftrennung drei Banden unterschiedlicher Stärke. Die sehr kompakte superhelikale DNA wandert am schnellsten, gefolgt von der durch Doppelstrangbruch linearisierten DNA und der relaxierten DNA, die durch einen Einzelstrangbruch ihre superhelikale

Struktur verloren hat und somit am langsamsten ist. Der Nachweis der in der Gelelektrophorese aufgetrennten Fragmente erfolgt mit Hilfe einer Ethidiumbromid-Färbung. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und fluoresziert in interkalierter Form unter UV-Bestrahlung orange. Diese Methode erlaubt einen sehr sensitiven DNA-Nachweis (ab 20 ng DNA pro Bande). Ethidiumbromid lagert sich in die DNA-Doppelhelix gleichmäßig ein, so dass außerdem eine relative Konzentrationsbestimmung der DNA anhand der Fluoreszenzintensität möglich ist.

Durchführung:

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

2.3.9 Gel-Elution

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

Dazu wurde zunächst eine Agarosegel hergestellt, in das große Taschen eingelassen waren. Eine möglichst große Menge DNA wurde nun in das Gel gefüllt und einer Gelelektrophorese unterzogen. Das Gelstückchen, welches das gewünschte Fragment enthielt, wurde mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben. Dazu wurden mindestens 600 µl Solubilisierungspuffer QG (Qiagen) pipettiert und das Gel darin im 50 °C warmen Wasserbad geschmolzen. Währenddessen wurde das Gefäß immer wieder geschüttelt, um eine gute Durchmischung des Gels und des Puffers zu gewährleisten. Nach der Schmelzen wurde noch so lange zusätzlicher Puffer QG dazupipettiert, bis der pH-Indikator eine Gelbfärbung zeigte. Dann wurde das Gemisch auf eine Zentrifugationssäule (Plasmid Mini-Kit, Qiagen) geladen und für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert. Der Beladungsvorgang wurde mehrfach wiederholt, bis die gesamte Gellösung aufgebraucht war. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Nach der letzten Zentrifugation wurde die Säule mit 500 µl Puffer QG gespült, für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurde die Membran mit 750 µl Waschpuffer PE (Qiagen) behandelt und für eine Minute bei RT inkubiert. Danach wurde die Säule zunächst für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen und der Zentrifugationsvorgang wiederholt, um letzte Pufferreste zu entfernen. Nun wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß gesteckt und 50 µl deionisiertes Wasser direkt auf die Membran gegeben. Nach einer Minute Inkubation bei RT wurde die Säule für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert, wobei die DNA eluiert wurde. Die Konzentration der aus dem Gel aufgereinigten DNA wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.3.5) und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.10 Ligation

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

2.3.11 Auffüllen von überhängenden Restriktionsenden mittels Klenow-Behandlung

Wenn DNA-Fragmente mit unzusammenpassenden Restriktionsenden, ligiert werden sollten, mussten die überhängenden Enden zunächst mittels Klenow-Behandlung aufgefüllt werden, sodass glatte Enden entstanden. Zu einem 25 µl-Verdau wurden 1 µl Klenow-Fragment (10 U/µl) und 1 µl dNTPs (je 10 mM) gegeben. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach diesem Vorgang konnte der Verdau wie unter 2.3.7 beschrieben aufgereinigt werden.

2.3.12 Transfektion von NIH-3T3-Zellen

Vorbereitung:

Drei Tage vor der geplanten Transfektion wurde eine 25 cm²-Zellkulturflasche mit NIH-3T3-Zellen in 10 ml Medium geerntet. 2 ml der geernteten Zellen wurden wie unter 2.2.6.16.1 beschrieben für die Erhaltungskultur verwendet. Zu den restlichen 8 ml geernteter Zellsuspension wurden weitere 10 ml Kulturmedium gegeben und die Suspension auf 18 Vertiefungen einer 24-Loch-Platte gegeben (1 ml pro Vertiefung). Die Zellen wurden 3 Tage bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert.

Transfektion:

Für zwei Transfektionen wurden 1800 ng Test-DNA (Expressionsplasmid) und 200 ng Kontroll-DNA pCMV-EGFP mit 250 µl IMDM gemischt (Lösung 1). Außerdem wurden 10 µl GenePorter Reagenz mit 250 µl IMDM gemischt (Lösung 2). Lösung 1 und Lösung 2 wurden nun zusammenpipettiert und 20 Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium von den NIH-3T3-Zellen auf der 24-Loch-Platte entfernt. Dann wurden 250 µl Transfektionsansatz pro Vertiefung auf die Zellen gegeben und fünf Stunden bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz wieder entfernt und statt dessen 250 µl Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Die transfizierten NIH-3T3-Zellen wurden weitere 72 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert.

Im Fluoreszenzmikroskop konnte nach 24-72 Stunden über die Grünfärbung der Zellen durch die Expression des pCMV-EGFP-Plasmids die Transfektionsrate abgeschätzt werden.

2.3.13 RNA-Isolierung

Zum einen wurde RNA aus unstimulierten und 72 Stunden mit 1 µg/ml KLH stimulierten Milzzellen und aufgereinigten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus i.p. immunisierten Mäusen isoliert. Um die Funktionalität der Expressionskonstrukte für die DNA-Immunsierung *in vitro* zu überprüfen wurde außerdem RNA aus transfizierten NIH-3T3-Zellen isoliert. Zuletzt wurde auch RNA aus CD11c⁺ dendritischen Zellen isoliert, die aus den drainierenden Lymphknoten von DNA-vakzinieren Mäusen gewonnen wurden.

Vorbereitung:

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

Die RNA-Isolierung muss in einer RNase-freien Umgebung stattfinden. Da RNasen auf der Körperoberfläche vorkommen, ist es notwendig Handschuhe zu tragen.

Außerdem ist darauf zu achten, dass alle Arbeitslösungen, die für die RNA-Isolierung benötigt werden, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser angesetzt werden. Der Enzyminhibitor DEPC deaktiviert die RNasen im Wasser. Es wurden nur Pipetten verwendet, die ausschließlich für die RNA-Isolierung eingesetzt werden.

Durchführung:

Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin® RNAII Total RNA Isolation Kit“ (Machery-Nagel, Düren).

Zunächst wurden die bei -20°C gelagerten Zellysate aufgetaut, zur Reduktion der Viskosität auf eine NucleoSpin® Filter-Säule gegeben und eine Minute bei RT und 11000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 350 µl 70-prozentigem EtOH verdünnt und die Lösung wurde auf eine NucleoSpin® RNA II Säule gegeben. Diese wurde für 30 Sekunden bei RT und 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Entsalzen der Membran wurden 350 µl Puffer MDB (Membrane Desalting Buffer) auf die Säule gegeben. Dann wurde die Säule erneut für eine Minute bei RT und 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um evtl. noch vorhandene genomische DNA zu verdauen, wurden 90 µl DNase Reaktionspuffer (Reaction buffer for DNase) mit 10 µl rekonstituierter RNase-freier DNase (1 U/µl) gemischt, direkt auf die Membran der Säule gegeben und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Puffer RA2 auf die Säule gegeben, um die Membran zu waschen. Die Säule wurde 30 Sekunden bei RT und 11000 x g abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde nun zweimal mit Puffer RA3 (600 µl und 250 µl) gewaschen. Die Säule wurde jeweils zentrifugiert (30 Sekunden und 2 Minuten bei RT und 11000 x g) und der Durchfluss verworfen. Nun wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und die RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser (Macherey-Nagel) durch einminütige Zentrifugation bei RT und 11000 x g eluiert. Ein Teil der isolierten RNA wurde für die Reverse Transkription eingesetzt und der Rest bei -80°C gelagert.

2.3.14 Reverse Transkription

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

Bei der Reversen Transkription wurden zunächst 11 µl RNA mit je 1 µl Oligo-dT-Primer (50 µmol/µl) und Random-Hexamerprimer (50 µmol/µl) in einem PCR-Eppendorfgefäß gemischt. Dieses Gemisch wurde zunächst für 5 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Dann wurde der Reaktionsansatz schnell auf Eis gestellt und es wurden 4 µl 5 x Puffer für Revert-Aid M-MuIV sowie 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM) zugefügt. Anschließend wurde die Mischung weitere 5 Minuten bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Zuletzt wurde 1 µl Revert-Aid M-MuIV (200 U/µl) dazu pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde erst für 60 Minuten bei 42°C, dann für 10 Minuten bei 75°C im Thermocycler inkubiert und zum Schluss auf 4°C abgekühlt. Nun wurde der cDNA-Gehalt der Probe bestimmt (2.3.5), und die cDNA wurde bis zu ihrer Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

2.3.15 Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR diente der Überprüfung der unter 3.3.1 klonierten Expressionsplasmide. Die Primerkombinationen wurden so gewählt, dass man die Übergänge zwischen den einzelnen Komponenten der Konstrukte nachweisen konnte.

Die PCR-Ansätze wurden wie folgt pipettiert:

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

Σ 20 µl

Das Reaktionsgemisch wurde in 500 µl PCR-Gefäße pipettiert.

Die Messung erfolgte im Thermocycler nach folgendem Protokoll:

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

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Phasen. Während der Denaturierung werden die DNA-Doppelstränge getrennt. Das Erhitzen auf 94 °C bewirkt, dass sich die Wasserstoffbrückenbindungen lösen. An die Einzelstrang-DNA binden während der „Annealingphase“ die Primer. Diese Phase findet bei einer moderaten Temperatur, meistens um die 60 °C statt. Die optimale Annealingtemperatur ist von der Primersequenz (GC-Gehalt und Anzahl der Nukleotide) abhängig. Während der

Elongationsphase baut die DNA-Polymerase beginnend an den 5'-Enden der Primer entlang der DNA-Matrize Nukleotide ein und komplettiert so die zu amplifizierenden Sequenzen. Die Denaturierungsphase des nächsten Zyklus sorgt für eine erneute Trennung der DNA-Doppelstränge.

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

2.3.16 Quantitative („Realtime“) –PCR

Bei der „Realtime“ PCR handelt es sich um eine Methode zum quantitativen Vergleich der Expressionsstärke von Genen. In dieser Arbeit wurde damit die Expression von Treg-Markergenen in Milzzellen aus hochdosig und niedrigdosig immunisierten Mäusen untersucht. Außerdem wurde die Expression der plasmidkodierten Gene in transfizierten NIH-3T3-Zellen und in CD11c⁺ dendritischen Zellen, die aus den drainierenden Lymphknoten von DNA-vakzinierten Mäusen gewonnen wurden, untersucht.

Bei der quantitativen PCR werden nach dem Elongationsschritt in jedem Zyklus die PCR-Produkte mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen detektiert. Dazu wurde der DNA-Farbstoff SYBR-Green eingesetzt, der in die große Furche der PCR-Produkte

stöchiometrisch interkaliert. Der Farbstoff kann dann zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der Menge doppelsträngiger DNA. Je größer die gebildeten Produktmengen, desto stärker ist auch die Fluoreszenz.

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

Die PCR-Ansätze wurden wie folgt pipettiert:

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

Σ 25 μl

Es wurden stets PCRs zur Messung mindestens eines Haushaltsgens (UBC) und eines bis mehrerer Testgene (mTGFβ1, mL-10, Foxp3) parallel durchgeführt. Um Störungen der Messung durch Pipettierungenauigkeiten möglichst gering zu halten, wurden zunächst „Mastermixe“ aus H₂O (Aqua B. Braun, B. Braun, Melsung), SYBR Green 490-Lösung und Primer-Mix für die berechnete Probenanzahl pipettiert und 24 μl dieses Reaktionsgemischs in eine Thermo-96-Loch-Platte (Corning) pipettiert. Dazu wurde je Vertiefung 1 μl der entsprechenden auf 200 ng/μl verdünnten cDNA pipettiert. Die Thermo-96-Loch-Platte wurde abschließend mit einer Abdeckfolie (Absolute QPCR Seal, Abgene) verschlossen. Die Platte wurde bei 300 x g kurz abzentrifugiert und bis zur Messung im Thermozykler bei -20°C gelagert.

Die Messung erfolgte im Thermozykler nach folgendem Protokoll:

Zyklus	Zyklenzahl	Zeit	Temperatur
1	1	15 Minuten	95 °C („Hot-Start“)
2	50	15 Sekunden 1 Minute	95 °C 60 °C
3	1	30 Sekunden 30 Sekunden 15 Sekunden	95 °C 60 °C 95 °C

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Untersuchungen im Mausmodell der Typ I Allergie durchgeführt, um die Effizienz verschiedener Therapiemodelle zu prüfen, wobei der Fokus auf der Generierung von regulatorischen T-Zellen und der Charakterisierung der Rolle von Treg bei der Kontrolle von Typ I Allergien lag.

3.1 Untersuchungen zur Etablierung eines Mausmodells der spezifischen Immuntherapie (SIT) zur Analyse der Rolle regulatorischer T-Zellen

Eine spezifische Immuntherapie (SIT) besteht in der wiederholten subkutanen Injektion von ansteigenden Dosen des spezifischen Allergens. Es ist bekannt, dass die SIT beim Menschen immunologische Veränderungen bewirkt wie die Inhibition der saisonalen Steigerung der allergenspezifischen IgE-Produktion, eine verstärkte Produktion blockierender IgG4-Antikörper, die reduzierte Anzahl von Effektorzellen am Entzündungsherd und die Inhibition der antigenspezifischen T-Zellproliferation. Außerdem wird die T-Zellbalance von Th2 nach Th1 verschoben und regulatorische T-Zellen werden induziert [Akdis und Blaser 1999, Lewis 2002, Frew 2003, Till et al. 2004]. Ein Allergie-Therapie-Modell mit Langzeiteffekt von Vissers et al. [2004] bildete die Grundlage für meine Versuche zur Untersuchung der Rolle von regulatorischen T-Zellen bei der Therapie von Typ I Allergien. Vissers et al. hatten ein SIT-Modell etabliert, das eine Sensibilisierungsphase, eine Therapiephase, eine Ruhezeit und eine lokale Provokation der Versuchsmäuse mit dem Modellallergen Ovalbumin beinhaltet. In Abwandlung von der klassischen SIT, bei der den Patienten das spezifische Allergen wiederholt und in ansteigenden Dosen verabreicht wird, sieht das Mausmodell von Vissers et al. eine Therapiephase vor, in der die Versuchstiere lediglich drei subkutane Injektionen mit der höchsten Allergendosis bekommen.

In Anlehnung an dieses Allergie-Therapie-Modell mit Langzeiteffekt von Vissers et al. [2004] wurde der unter Abb. 3.1.1 dargestellte Versuchsaufbau angelegt.

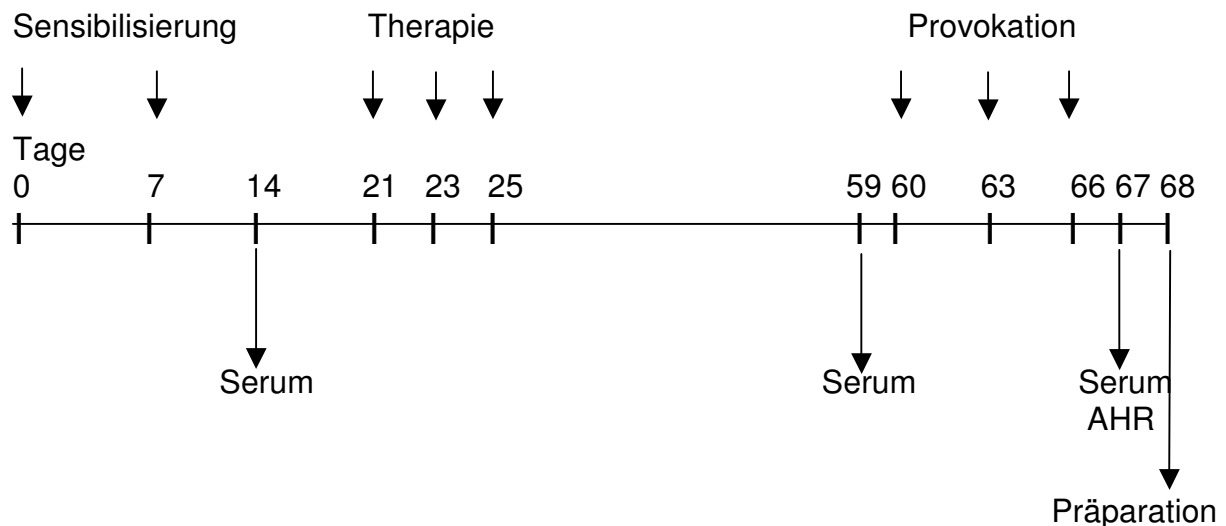


Abb. 3.1.1 Immunisierungsschema zum SIT-Modell

In Anlehnung an das von Vissers et al. 2004 publizierte SIT-Modell mit Langzeit-Therapieeffekt wurde das hier abgebildete Immunisierungsschema etabliert und angewendet. Das Modell beinhaltet eine Sensibilisierungs-, Therapie- und Provokationsphase. Die allergenspezifische Immunreaktion wurde im Versuchsverlauf regelmäßig mittels der Quantifizierung spezifischer IgE-Antikörper in den Seren der Versuchsmäuse überprüft. Die lokale Reaktion der Mäuse wurde durch eine Messung der Atemwegsreaktivität sowie Analysen der zellulären Zusammensetzung der BAL und der Zytokinproduktion (BAL, Lymphknotenzellkulturen) evaluiert.

BALB/cJ-Mäuse wurden zweimal im Abstand von einer Woche intraperitoneal mit 1 µg OVA adsorbiert an Alum immunisiert. Eine Woche nach der Sensibilisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen und die OVA-spezifischen IgE-Mengen in den Seren wurden bestimmt. Die Tiere wurden dann in Gruppen à vier Mäuse mit vergleichbarem mittleren IgE-Gehalt in den Seren eingeteilt, die im Anschluss unterschiedlichen Behandlungen unterzogen wurden (Abb. 3.1.2).

Zwei Wochen nach der Sensibilisierung erfolgte die Therapiephase. Den Tieren wurde dreimal im Abstand von jeweils zwei Tagen hohe Dosen des relevanten Antigens OVA oder des irrelevanten Kontrollantigens BSA injiziert. Zwei Gruppen wurden zur Kontrolle nicht weiter behandelt.

Vier Wochen nach der Therapiephase wurde den Mäusen wieder Blut abgenommen und der Gehalt an OVA-spezifischen IgE-Antikörpern in den Seren wurde erneut mittels ELISA bestimmt (Abb. 3.1.3 vor der Provokation).

Im Anschluss wurde eine lokale Reaktion in den Lungen der Mäuse durch die intranasale Applikation von 250 µg OVA provoziert. Die intranasale OVA-Gabe erfolgte dreimal im Abstand von jeweils drei Tagen. Eine Kontrollgruppe wurde mit lediglich PBS intranasal behandelt. Danach wurde erneut die Menge des OVA-spezifischen IgE in den Seren bestimmt (Abb. 3.1.3 nach der Provokation).

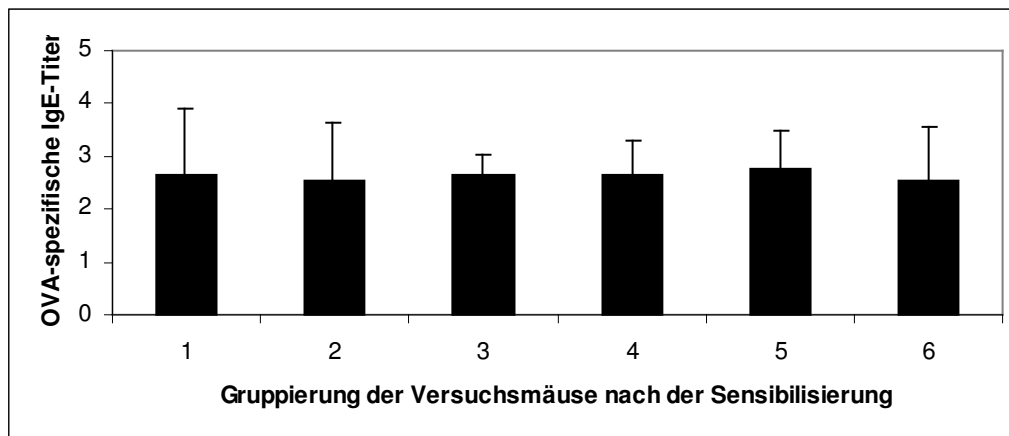
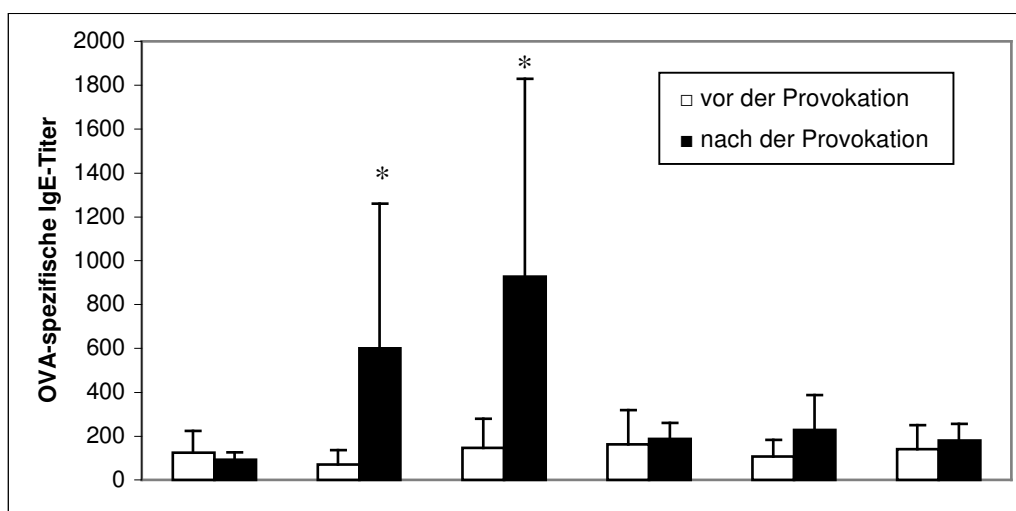


Abb. 3.1.2: IgE-Gehalt nach der Sensibilisierung

BALB/c-Mäuse wurden mit 1 µg OVA/Alum sensibilisiert und die antigenspezifischen IgE-Titer in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD der IgE-Titer individueller Seren. Die Mäuse wurden nach der Sensibilisierung anhand des IgE-Gehalts so in Gruppen à vier Tiere aufgeteilt, dass die OVA-spezifischen Serum-IgE-Titer in den Gruppen im Mittel auf dem gleichen Niveau lagen. Die Gruppen wurden in der Therapiephase folgendermaßen weiter behandelt: 1 + 2) keine Behandlung, 3) 1mg OVA / Alum i.p., 4) 1mg OVA / Alum s.c., 5) 1mg OVA / PBS s.c., 6) 1mg BSA / Alum s.c.



Therapie	-	-	1mg OVA/ Alum i.p	1mg OVA/ Alum s.c.	1mg OVA/ PBS s.c.	1mg BSA/ Alum s.c.
Intranasale Provokation	PBS	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA

Abb. 3.1.3: OVA-spezifische IgE-Mengen in den Mausseren nach der Provokation

BALB/c-Mäuse wurden mit 1 µg OVA/Alum sensibilisiert und in der Therapiephase wie dargestellt behandelt. Im Anschluss an die Therapiephase wurden die Mäuse durch intranasale Gabe von 250 µg OVA provoziert. Eine Kontrollgruppe wurde lediglich mit PBS intranasal behandelt. Vor (weiße Balken) und nach (schwarze Balken) der Provokationsphase wurde den Mäusen Blut abgenommen und die OVA-spezifischen IgE-Mengen in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte +/- SD von 8 Mäusen aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Unterschiede der jeweiligen Gruppen zur nicht therapierten, OVA-provozierten Kontrollgruppe sind nicht signifikant. Signifikante Unterschiede zwischen der IgE-Produktion vor und nach der Provokation innerhalb einer Gruppe sind durch einen Stern gekennzeichnet (* p < 0,05).

Vor der intranasalen OVA-Applikation waren in allen Gruppen moderate Mengen an OVA-spezifischen IgE-Antikörpern messbar. Die intranasale Provokation mit OVA führte in den Tieren, die nicht therapeutisch behandelt wurden zu einer signifikanten Steigerung der IgE-Produktion. Die Unterschiede in den Serum-IgE-Titern der behandelten Tiere zu den nicht therapierten Tieren waren statistisch nicht signifikant. Die Therapie mit subkutanen Injektionen hoher OVA-Dosen pur oder adsorbiert an Alum führte zu einer Inhibition dieser gesteigerten IgE-Produktion. Dieser Effekt war jedoch nicht spezifisch, da auch mit der Injektion des irrelevanten Kontrollantigens BSA eine Suppression des Anstiegs der IgE-Produktion erzielt wurde. Die intraperitoneale Applikation von 1 mg OVA adsorbiert an Alum führte hingegen zu einer leichten Steigerung der IgE-Produktion im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle.

Nach der intranasalen Provokation wurde außerdem die lokale Entzündungsreaktion anhand der Bestimmung der Atemwegsreaktivität der Versuchstiere gemessen (Abb. 3.1.4).

In den Versuchstieren, denen in der Provokationsphase PBS intranasal appliziert worden war, beeinflusste die Stimulation mit Methacholin kaum die Atemwegsreaktivität (Abb. 3.1.4, grüne Balken). Es wurde lediglich eine reizbedingte Steigerung des Penh-Wertes um den Faktor 1,4 - 1,8 gemessen. Dagegen kam es in den nicht therapierten, mit OVA intranasal provozierten Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der Atemwegsreaktivität (Abb. 3.1.4, rote Balken). Die Penh-Werte waren unter Methacholineinfluss 1,9 - 3,7 mal so hoch wie der Basiswert ohne den Methacholinreiz.

Die AHR-Messung zeigte in keiner der therapierten Gruppen eine Inhibition der AHR. Verglichen mit den nicht therapierten, PBS i.n. behandelten Mäusen (grüne Balken) war in allen therapierten, OVA-provozierten Tieren die Atemwegsreaktivität signifikant gesteigert. In Übereinstimmung mit den hohen IgE-Messwerten nach der intranasalen Provokation (siehe Abb. 3.1.3) war in der OVA/Alum i.p. behandelten Gruppe (Abb. 3.1.4, schwarze Balken) sogar eine AHR-Steigerung gegenüber der nicht therapierten, OVA i.n. provozierten Gruppe messbar. Diese war jedoch nicht signifikant.

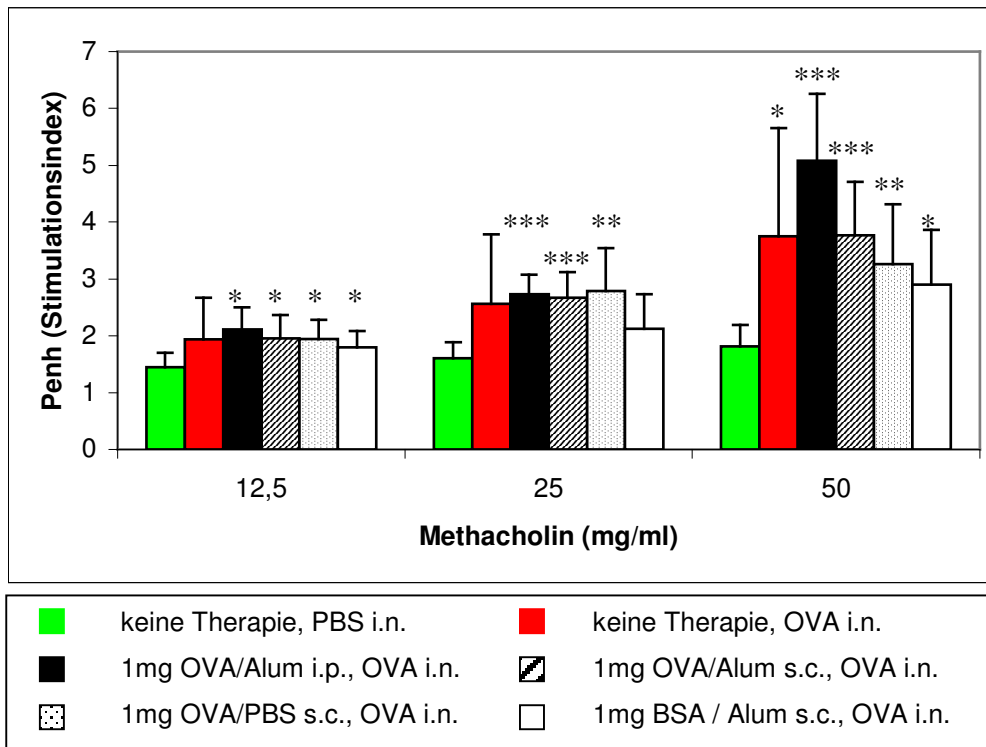


Abb. 3.1.4: Messung der Atemwegshyperreaktivität im Ganzkörperplethysmographen

BALB/c-Mäuse wurden mit 1 µg OVA/Alum sensibilisiert und in der Therapiephase wie dargestellt behandelt. Im Anschluss an die Therapiephase wurden die Mäuse durch intranasale Gabe von 250 µg OVA provoziert. Eine Kontrollgruppe wurde lediglich mit PBS intranasal behandelt. Die Atemwegsreaktivität wurde im Ganzkörperplethysmographen nach Applikation steigender Methacholindosen gemessen. Die Atemwegsreaktivität ist hier als Stimulationsindex, d.h. als Steigerung des Penh-Wertes unter Methacholineinfluss im Verhältnis zum Basiswert vor der Methacholingabe dargestellt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD von 8 Mäusen aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Unterschiede der jeweiligen Gruppen zur nicht therapierten, OVA-provozierten Kontrollgruppe (rote Balken) sind nicht signifikant. Signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen zur nicht therapierten, PBS-provozierten Kontrollgruppe (grüne Balken) sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Einen Tag nach der Messung der Atemwegsreaktivität wurden die Mäuse mit CO₂ getötet. Es wurde eine Lungenspülung (BAL) durchgeführt, die dabei gewonnene Flüssigkeit wurde abzentrifugiert und die Überstände (BAL-Flüssigkeit = BALF) wurden von den Zellen getrennt. Die Überstände wurden sofort für spätere Zytokinbestimmungen eingefroren, um einen enzymatischen Abbau der Zytokine zu verhindern. Die Zellen wurden auf Objektträger zentrifugiert und die so entstandenen Zytospins wurden mittels DiffQuick-Färbung gefärbt, so dass man die einzelnen Zellpopulationen im Lichtmikroskop differenzieren konnte. Die prozentuale Verteilung der Makrophagen, Lymphozyten sowie eosinophilen und neutrophilen Granulozyten

wurde bestimmt, indem von jedem Objektträger mindestens 300 Zellen gezählt wurden (siehe Abb. 3.1.5).

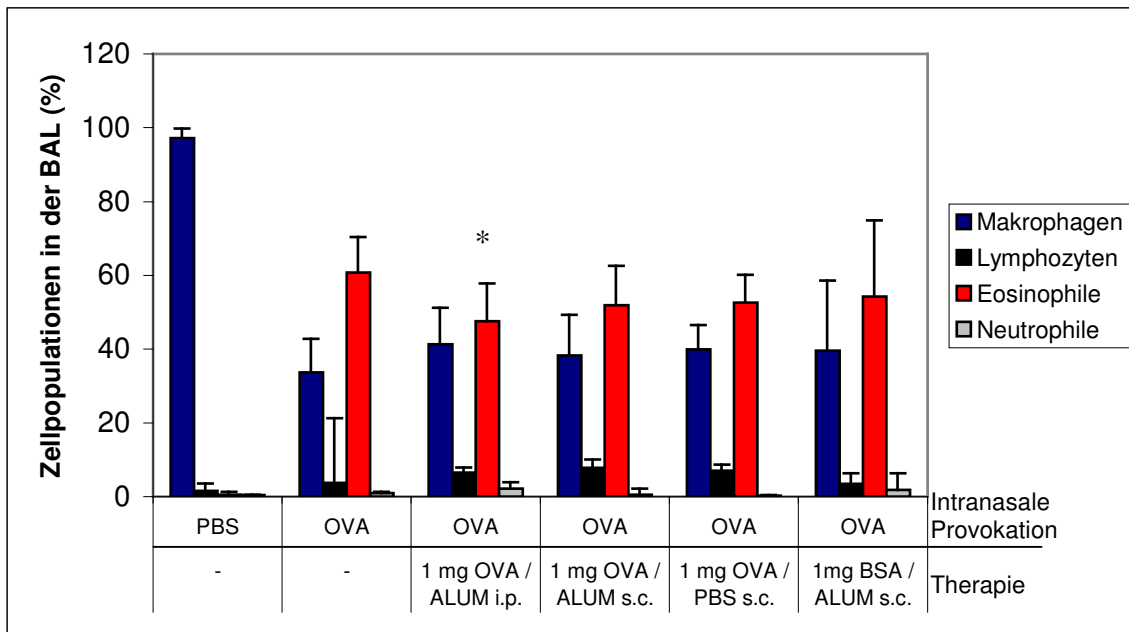


Abb. 3.1.5: Analyse der Verteilung verschiedener Zellpopulationen in der BAL

BALB/c-Mäuse wurden mit 1 µg OVA/Alum sensibilisiert und in der Therapiephase wie dargestellt behandelt. Im Anschluss an die Therapiephase wurden die Mäuse durch intranasale Gabe von 250 µg OVA provoziert. Eine Kontrollgruppe wurde lediglich mit PBS intranasal behandelt. Zwei Tage später wurde eine Lungenspülung durchgeführt. Von den Zellen der BAL wurden Zytospin-Präparate angefertigt. Diese wurden mit DiffQuick gefärbt und die verschiedenen Zellen wurden anhand morphologischer Parameter sowie anhand des Färbeverhaltens identifiziert und gezählt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der prozentualen Verteilung +/- SD von 8 Mäusen aus zwei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen zur nicht therapierten, OVA-provozierten Gruppe sind durch einen Stern gekennzeichnet (* p < 0,05).

Während sich in der BAL von nicht therapierten Mäusen, die intranasal mit PBS behandelt wurden, fast ausschließlich Makrophagen (~97%) befanden, kam es durch die intranasale Provokation mit OVA in den nicht therapierten Mäusen zu einem starken Einstrom von eosinophilen Granulozyten in die Lunge (~61%). Die verschiedenen Therapien konnten die Lungeneosinophilie im Vergleich zur dieser Gruppe nicht signifikant vermindern (~52-54%). Dies stimmt auch mit den Ergebnissen aus der AHR-Messung überein. Lediglich in der OVA/Alum i.p. behandelten Gruppe kam es zu einem signifikant geringeren Eosinophileneinstrom in die Lunge (~48%). Dieses Ergebnis ist aufgrund der hohen IgE-Messwerte (siehe Abb. 3.1.3) und der starken AHR (siehe Abb. 3.1.4) in dieser Gruppe erstaunlich. Es wurden nur wenige Lymphozyten und neutrophile Granulozyten in allen Gruppen gefunden.

Insgesamt ließ sich gemessen an der Atemwegsreaktivität und der zellulären Zusammensetzung der BAL kein Therapieerfolg einer subkutanen Injektion des Antigens im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung nachweisen.

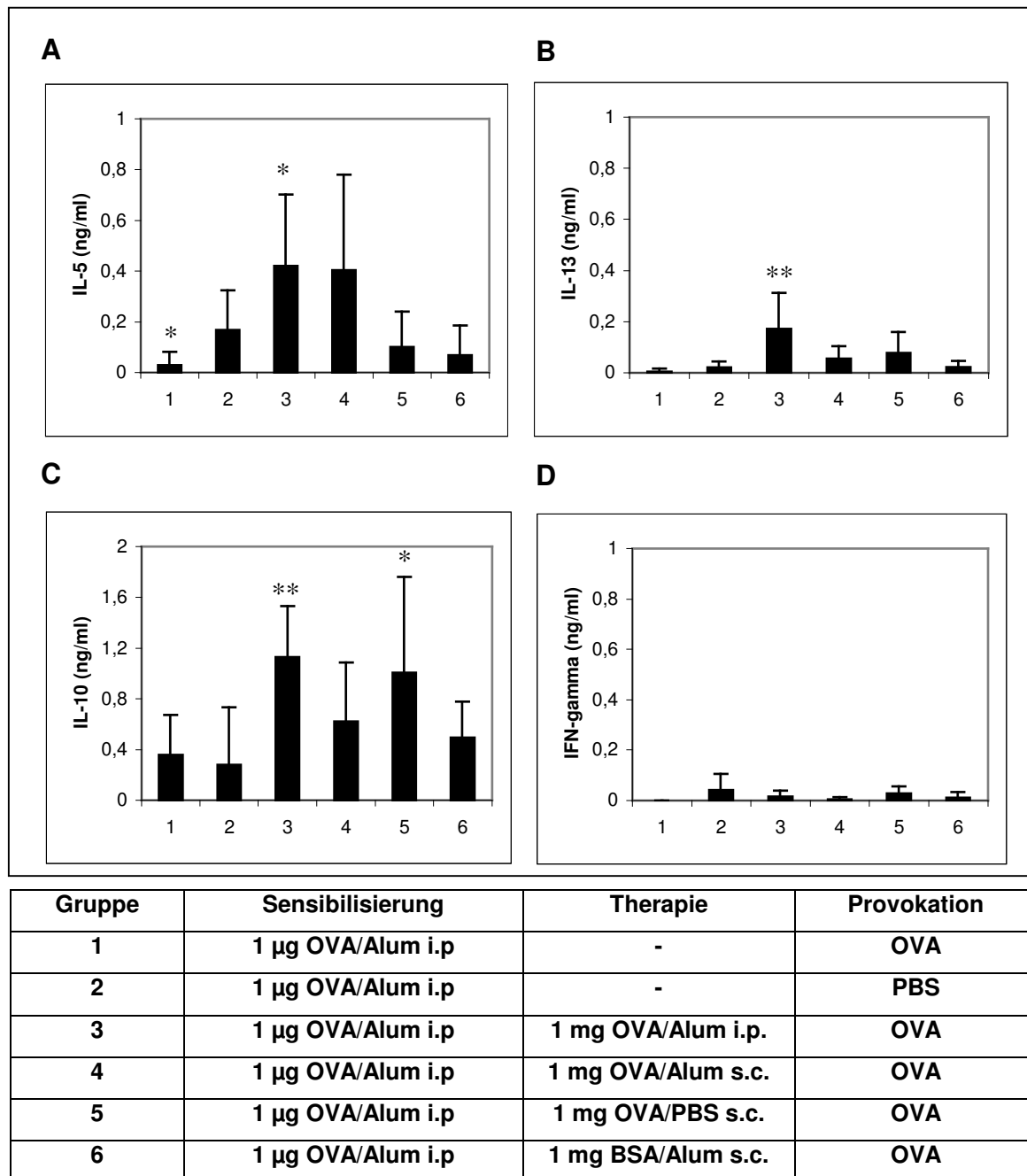


Abb. 3.1.6: Zytokinkonzentrationen in den BAL-Flüssigkeiten

BALB/c-Mäuse wurden mit 1 µg OVA/Alum sensibilisiert und in der Therapiephase wie dargestellt behandelt. Im Anschluss an die Therapiephase wurden die Mäuse durch intranasale Gabe von 250 µg OVA provoziert. Eine Kontrollgruppe wurde lediglich mit PBS intranasal behandelt. Zwei Tage später wurde eine Lungenspülung durchgeführt und die Zytokine IL-5 (A), IL-13 (B), IL-10 (C) und IFN-γ (D) wurden mittels ELISA in den BAL-Flüssigkeiten nachgewiesen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Zytokinkonzentrationen +/- SD von 8 Mäusen aus zwei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen zur nicht therapierten, OVA-provozierten Gruppe sind durch Sterne gekennzeichnet (* p < 0,05, ** p < 0,01).

In den BAL-Flüssigkeiten wurden die Zytokine IL-5, IL-13, IL-10 und IFN- γ mittels Zytokin-ELISA nachgewiesen (Abb. 3.1.6).

Insgesamt waren in den BAL-Flüssigkeiten nur sehr geringe Zytokinmengen messbar. Die Konzentrationen der Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 (Abb. 3.1.6 A und B) waren sehr niedrig, unter 1 ng/ml. Diese Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der lokalen Asthmareaktion, z.B. durch die Rekrutierung von Th2-Zellen und eosinophilen Granulozyten.

In den Kontrolltieren, in denen die intranasale PBS-Gabe keine lokale Immunreaktion in den Atemwegen induzierte, wurden in der BAL-Flüssigkeit nur sehr geringe Mengen an Zytokinen detektiert. Lediglich IL-10 wurde in diesen Tieren in Mengen gemessen, die deutlich über der Nachweisgrenze des ELISA-Detektionssystems (IL-5 0,029 - 0,109 ng/ml, IL-13 0,007 - 0,018 ng/ml, IL-10 0,042 - 0,102 ng/ml, IFN- γ 0,004 - 0,033 ng/ml) lagen. Durch die lokale Provokation mit OVA kam es in den nicht therapierten Mäusen zu einem Anstieg des IL-5-Gehalts, was die Rekrutierung von Th2-Zellen und Eosinophilen in die Lunge impliziert. Da die lokale IL-10-Produktion unverändert niedrig blieb, kam es in dieser Gruppe zu einem hohen IL-5-zu-IL-10-Verhältnis (1,16). Von Vissers et al. [2004] wurde eine Verschiebung des IL-5-zu-IL-10-Verhältnisses zugunsten von IL-10 als Charakteristikum einer erfolgreichen SIT dargestellt. Deshalb wurden hier für alle Einzeltiere die IL-5-zu-IL-10-Verhältnisse in den BAL-Flüssigkeiten errechnet und die Mittelwerte \pm SD sind in Abb. 3.1.7 dargestellt.

Die Therapie mit 1 mg OVA/PBS subkutan (Gruppe 5) führte zu einer moderaten, aber nicht signifikanten Reduzierung des IL-5 in der Lunge. Außerdem war die IL-10-Produktion in dieser Gruppe signifikant erhöht. Daraus ergibt sich verglichen mit der nicht therapierten, OVA-provozierten Gruppe eine Verschiebung des IL-5-zu-IL-10-Verhältnisses zugunsten von IL-10 (0,08). Die OVA/PBS subkutan behandelte Gruppe ist die einzige, deren IL-5-zu-IL-10-Verhältnis verglichen mit den nicht therapierten, OVA-provozierten Mäusen signifikant vermindert ist (siehe Abb. 3.1.7). Allerdings ergab sich auch nach der subkutanen Behandlung mit Kontrollantigen BSA/Alum (Gruppe 6) eine starke Verschiebung des IL-5-zu-IL-10-Verhältnisses zugunsten von IL-10 (0,14). Zu dieser Verschiebung kam es, da auch die Therapie mit dem irrelevanten Kontrollantigen zu einer lokalen IL-5-Inhibition führte. Der inhibitorische Effekt einer subkutanen Behandlung mit OVA/PBS auf die IL-5-Produktion in der Lunge war also nicht spezifisch. In den mit BSA/Alum s.c.

behandelten Tieren kam es allerdings nicht zu einem signifikanten Anstieg der IL-10-Produktion, was zu dem etwas größeren IL-5-zu-IL-10-Verhältnis als in den mit OVA s.c. behandelten Mäusen führte (BSA/Alum s.c.: 0,14, OVA/PBS s.c.: 0,08).

In den mit OVA/Alum subkutan behandelten Mäuse (Gruppe 4) konnte die IL-5-Produktion in der Lunge nicht inhibiert werden. Es kam sogar zu einem leichten, aber nicht signifikanten Anstieg der IL-5-Konzentration in den BAL-Flüssigkeiten verglichen mit der nicht therapierten, OVA-provozierten Gruppe. Gleichzeitig war jedoch auch ein leichter Anstieg der IL-10-Konzentration in den BAL-Flüssigkeiten zu verzeichnen. Für diese Gruppe ergibt sich ein IL-5-zu-IL-10-Verhältnis von 1,31. Bezogen auf die Zytokinkonzentrationen in den BAL-Flüssigkeiten, war die Therapie mit OVA/Alum subkutan nicht erfolgreich.

In keiner der Therapiegruppen war ein inhibitorischer Effekt auf die lokale IL-13-Produktion zu verzeichnen.

In mit OVA/Alum intraperitoneal behandelten und OVA-provozierten Mäusen (Gruppe 3) waren die IL-5- und die IL-13-Konzentrationen in der Lunge verglichen mit den nicht therapierten, OVA-provozierten Mäusen signifikant erhöht. Auch die lokale IL-10-Produktion war in dieser Gruppe signifikant erhöht.

Die Menge des Th1-Zytokins IFN- γ (Abb. 3.1.6 D) war besonders niedrig und bei einigen Tieren unter der Nachweisgrenze. Die IFN- γ -Messwerte waren in keiner der Gruppen signifikant erhöht, es kam also nicht zu einer Verschiebung der Immunantwort in Richtung einer Th1-Polarisierung.

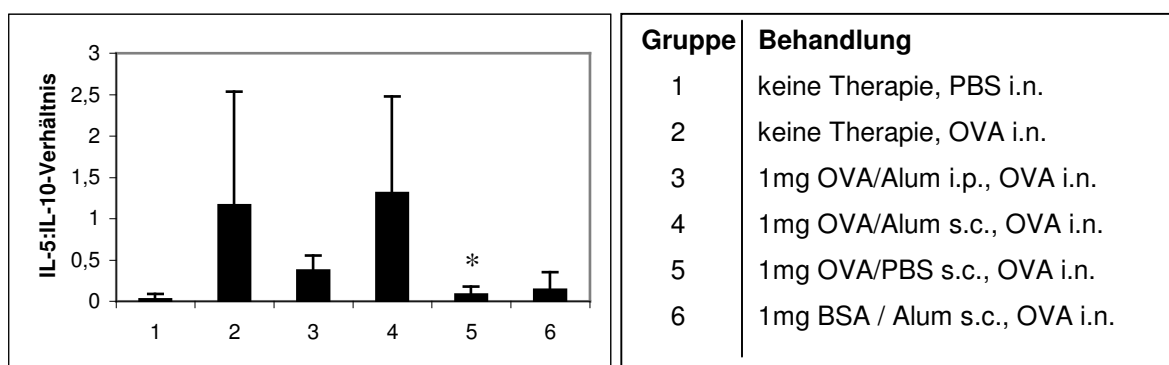


Abb. 3.1.7: IL-5:IL-10-Verhältnisse in den BAL-Flüssigkeiten

BALB/c-Mäuse wurden mit 1 μ g OVA/Alum sensibilisiert und in der Therapiephase wie dargestellt behandelt. Im Anschluss an die Therapiephase wurden die Mäuse durch intranasale Gabe von 250 μ g OVA provoziert. Eine Kontrollgruppe wurde lediglich mit PBS intranasal behandelt. Zwei Tage später wurde eine Lungenspülung durchgeführt. Die Zytokine wurden mittels ELISA in den BAL-Flüssigkeiten nachgewiesen und die IL-5:IL-10-Verhältnisse bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der IL-5:IL-10-Verhältnisse \pm SD von 8 Mäusen aus zwei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen zur nicht therapierten, OVA-provozierten Gruppe sind durch einen Stern gekennzeichnet (* $p < 0,05$).

Zusammengefasst führte die subkutane Injektion des Antigens OVA in PBS gemessen an der Zytokinbestimmung in der BAL-Flüssigkeit zu einem Therapieerfolg. Die lokale Inhibition der IL-5-Produktion einhergehend mit einer signifikanten Steigerung der IL-10-Produktion resultierte in einer signifikanten Verminderung des IL-5:IL-10-Verhältnisses. Zwar wurde die Inhibition der lokalen IL-5-Produktion auch durch die Injektion des irrelevanten Kontrollantigens BSA erreicht, diese Behandlung führte jedoch nicht zu einem Anstieg der IL-10-Produktion in der Lunge.

Des Weiteren wurden die thorakalen Lymphknoten präpariert und die Lymphknotenzellen für 72 Stunden durch Zugabe des Antigens OVA restimuliert. Die Mengen der Zytokine IL-5, IL-13, IL-10 und IFN- γ in den Kulturüberständen wurden mittels Sandwich-ELISA bestimmt (siehe Abb. 3.1.8).

In den nicht therapierten, mit PBS intranasal behandelten Kontrolltieren wurden in den Kulturüberständen nur vergleichsweise geringe Mengen an Zytokinen detektiert. In diesen Mäusen fand keine lokale Immunreaktion statt, wie auch schon durch die Analyse der Atemwegsreaktivität (Abb. 3.1.4) und der zellulären Zusammensetzung der BAL (Abb. 3.1.5) bzw. der Zytokinkonzentrationen in den BAL-Flüssigkeiten (Abb. 3.1.6) gezeigt wurde. Für IL-13 und IFN- γ lagen die messbaren Zytokinkonzentrationen in den Lymphknotenzellkulturüberständen in der Nähe der Nachweisgrenze des ELISA-Detektionssystems (IL-5 0,041 - 0,055 ng/ml, IL-13 0,007 - 0,018 ng/ml, IL-10 0,157 - 0,190 ng/ml, IFN- γ 0,004 - 0,006 ng/ml). Die lokale Provokation mit OVA führte in den nicht therapierten Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der Th2-Zytokine in den Kulturüberständen. Die restimulierten Lymphknotenzellen produzierten große Mengen IL-5 und IL-13 sowie IL-10. Es wurden nur geringe Mengen des Th1-Zytokins IFN- γ nachgewiesen und die Produktion dieses Zytokins war außerdem antigen-unspezifisch.

Alle therapierten Mäuse produzierten große Mengen der Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 (Abb. 3.1.8 A und B). In keiner der Therapiegruppen kam es zu einer signifikanten Inhibition dieser Zytokine im Vergleich zur nicht therapierten, OVA-provozierten Gruppe.

Obwohl die Therapie mit OVA/PBS subkutan zu einer Inhibition der IL-5-Produktion und zu einer signifikanten Steigerung der IL-10-Produktion in der Lunge geführt hatte (Abb. 3.1.6), konnte dieser Effekt anhand der Zytokinbestimmung in den

Kulturüberständen von restimulierten thorakalen Lymphknotenzellen nicht nachgewiesen werden. Es kam zwar zu einem leichten Anstieg der IL-10-Produktion, jedoch ging dieser mit einem moderaten Anstieg der IL-5-Produktion verglichen mit der nicht therapierten, OVA-provozierten Gruppe einher (Abb. 3.1.8).

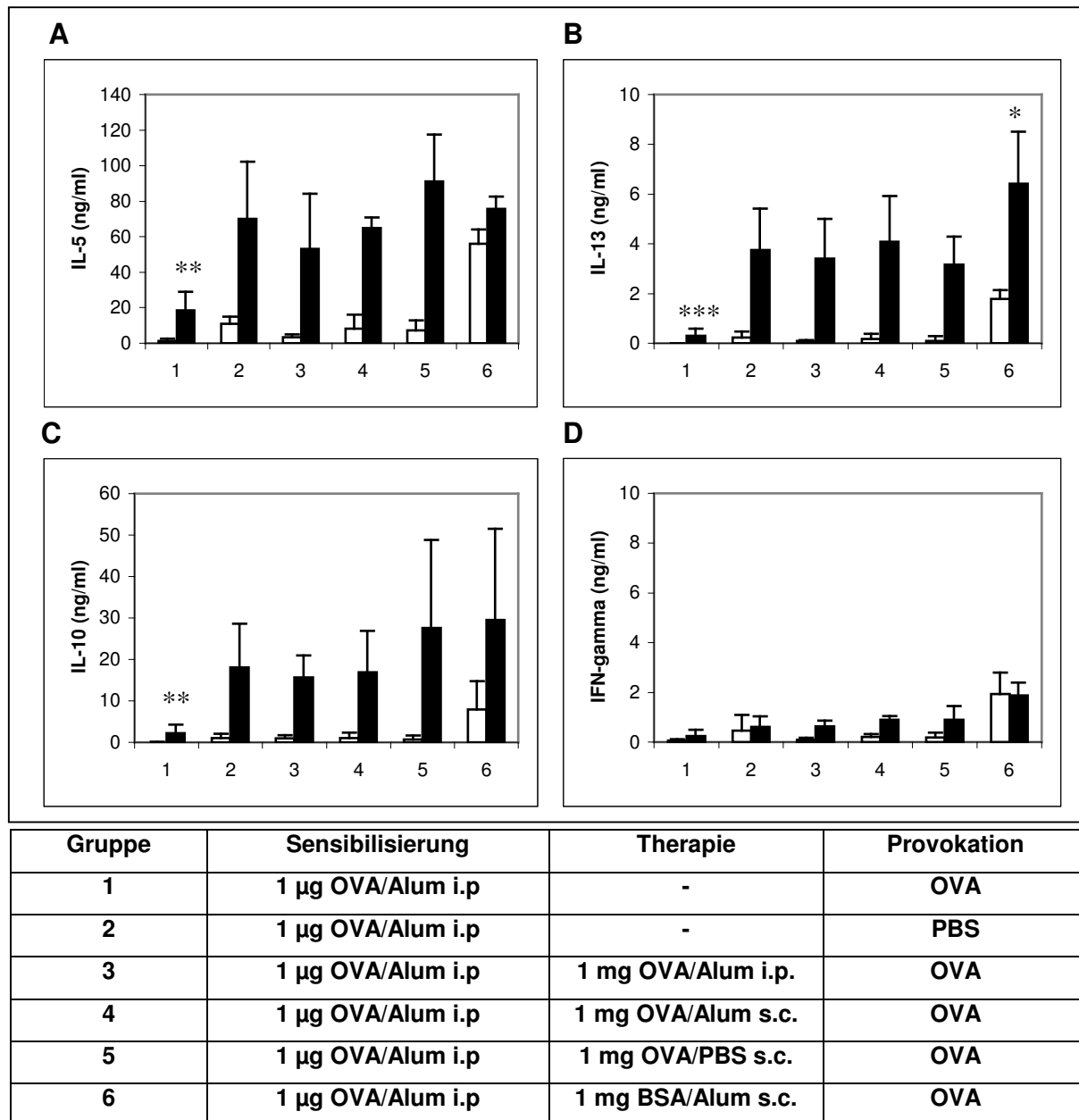


Abb. 3.1.8: Zytokin-ELISA von Lymphknotenkulturüberständen aus SIT- und Kontrollmäusen
BALB/c-Mäuse wurden mit 1 µg OVA/Alum sensibilisiert und in der Therapiephase wie dargestellt behandelt. Im Anschluss an die Therapiephase wurden die Mäuse durch intranasale Gabe von 250 µg OVA provoziert. Eine Kontrollgruppe wurde lediglich mit PBS intranasal behandelt. Zwei Tage später wurde die thorakalen Lymphknoten präpariert und die Lymphknotenzellen für 72 Stunden ohne (weiße Balken) oder mit 200 µg/ml OVA (schwarze Balken) kultiviert. Die Zytokine IL-5 (A), IL-13 (B), IL-10 (C) und IFN-γ (D) wurden anschließend mittels ELISA in den Kulturüberständen nachgewiesen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Zytokinkonzentrationen +/- SD von zwei unabhängigen Versuchen mit je 4 Mäusen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen zur nicht therapierten, OVA-provozierten Gruppe sind durch Sterne gekennzeichnet (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

Auch in den mit OVA/Alum s.c. behandelten Mäusen gab es gemessen an den Zytokinen in den Lymphknotenzellkulturüberständen keinen Therapieerfolg. Die Tiere dieser Gruppe produzierten genau so viel IL-5, IL-13, IL-10 und IFN- γ wie die nicht therapierten, OVA-provozierten Mäuse.

In der BSA/Alum subkutan behandelten Gruppe kam es zu einer starken antigen-unspezifischen Produktion aller gemessenen Zytokine IL-5, IL-13, IL-10 und IFN- γ . Besonders auffallend ist die in den Abbildungen 3.1.8 A und D gezeigte antigen-unspezifische IL-5- und IFN- γ -Produktion.

In der mit OVA/Alum i.p. behandelten und OVA-provozierten Gruppe war eine geringe, aber nicht signifikante IL-5-Inhibition im Vergleich zur nicht therapierten, OVA-provozierten Gruppe zu verzeichnen (Abb. 3.1.8 A). Dies unterscheidet sich von den Zytokinmessungen in der BAL-Flüssigkeit, wo die intraperitoneal behandelten Mäuse die stärkste IL-5-Produktion aufwiesen (Abb. 3.1.6 A). Auch die IL-10-Produktion der thorakalen Lymphknotenzellen (Abb. 3.1.8 C) ist im Gegensatz zum IL-10-Gehalt in der BAL-Flüssigkeit (Abb. 3.1.6 C) nicht gesteigert.

Alle Gruppen produzierten ebenfalls große Mengen des Th2-Zytokins IL-13 (Abb. 3.1.8 B). In keiner der Therapiegruppen kam es zu einer signifikanten Inhibition der antigenspezifischen IL-13-Produktion im Vergleich zur nicht therapierten, OVA-provozierten Gruppe. In der BSA/Alum subkutan behandelten Gruppe kam es zu einem leichten Anstieg der IL-13-Produktion, allerdings war auch die unspezifische IL-13-Produktion erhöht.

Wie in der BAL-Flüssigkeit (Abb. 2.1.6 D) konnten auch in den Überständen der Lymphknotenzellkulturen (Abb. 3.1.8 D) nur geringe Mengen des Th1-Zytokins IFN- γ nachgewiesen werden. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe, dass die subkutane Applikation von OVA/PBS die allergische Immunantwort zumindest teilweise inhibieren konnte (IgE, Zytokine in der BAL-Flüssigkeit). Diese inhibitorischen Effekte waren jedoch nicht antigenspezifisch, da sich auch mit der subkutanen Applikation des irrelevanten Antigens BSA vergleichbare Effekte erzielen ließen. Die intraperitoneale Injektion hoher OVA-Dosen adsorbiert an Alum führte hingegen nach vorhergehender Sensibilisierung stets zu einer Steigerung der systemischen und lokalen allergischen Immunantwort (IgE, AHR, lokale Zytokinproduktion). Die

Ergebnisse sind jedoch nicht kohärent mit denen von Vissers et al. [2004]. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Therapieerfolge mit der subkutanen Injektion des Antigens OVA sind nicht so stark ausgeprägt und zudem in den meisten Fällen mit den Effekten der antigen-unspezifischen Therapie vergleichbar. Insgesamt konnten daher in dieser Arbeit mit den Experimenten, die auf dem Allergie-Therapie-Modell mit Langzeiteffekt von Vissers et al. aufbauten, keine antigenspezifischen Therapie-Effekte nachgewiesen werden.

3.2 Untersuchungen zur Rolle regulatorischer T-Zellen bei der antigendosisabhängigen Regulation der IgE-Produktion

Ein alternatives Mausmodell für die SIT wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Kölsch in Münster etabliert. Sie führten Immunisierungsversuche im Mausmodell durch, in denen sie die Immunantwort von CBA/J-Mäusen auf verschiedene Antigene/Allergene (KLH und PLA₂) und auf verschiedene Immunisierungsdosen untersuchten. Sie zeigten, dass die Produktion antigenspezifischer IgE-Antikörper abhängig von der Immunisierungsdosis ist: Eine Immunisierung mit niedrigen Antigen Dosen führte zu einer starken Induktion der IgE-Produktion, während nach Immunisierung mit hohen Antigen Dosen nur geringe Mengen antigenspezifischen IgEs in den Mäusen nachweisbar waren. Bekanntermaßen führt die klassische SIT durch die Applikation hoher Antigen Dosen zu immunologischen Veränderungen wie der Verschiebung der Immunantwort von einer Th2- zu einer Th1-Polarisierung (Zytokinproduktion, Antikörperisotypen) und der Induktion von regulatorischen T-Zellen. Die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Kölsch in Münster zur Untersuchung des Antigen Dosis Effekts auf die Regulation der IgE-Produktion implizierten, dass in diesem System regulatorische T-Zellen eine Rolle spielen könnten. Deshalb habe ich dieses Modell gewählt, um weitere Untersuchungen zur Rolle regulatorischer T-Zellen bei der Regulation von Typ I Allergien durchzuführen und die Zellpopulation, die die antigendosisabhängige IgE-Produktion reguliert, zu identifizieren und zu charakterisieren.

3.2.1 Antikörper-Produktion nach Immunisierung mit niedrigen und hohen Antigen-Dosen

BALB/cJ-Mäuse wurden intraperitoneal repetitiv alle 14 Tage mit 0,1 μg (K01) bzw. 100 μg KLH (K100) adsorbiert an Alum immunisiert. Eine Woche nach jeder Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen und die KLH-spezifischen IgE-Mengen in den Seren wurden mittels ELISA gemessen (Abb. 3.2.1).

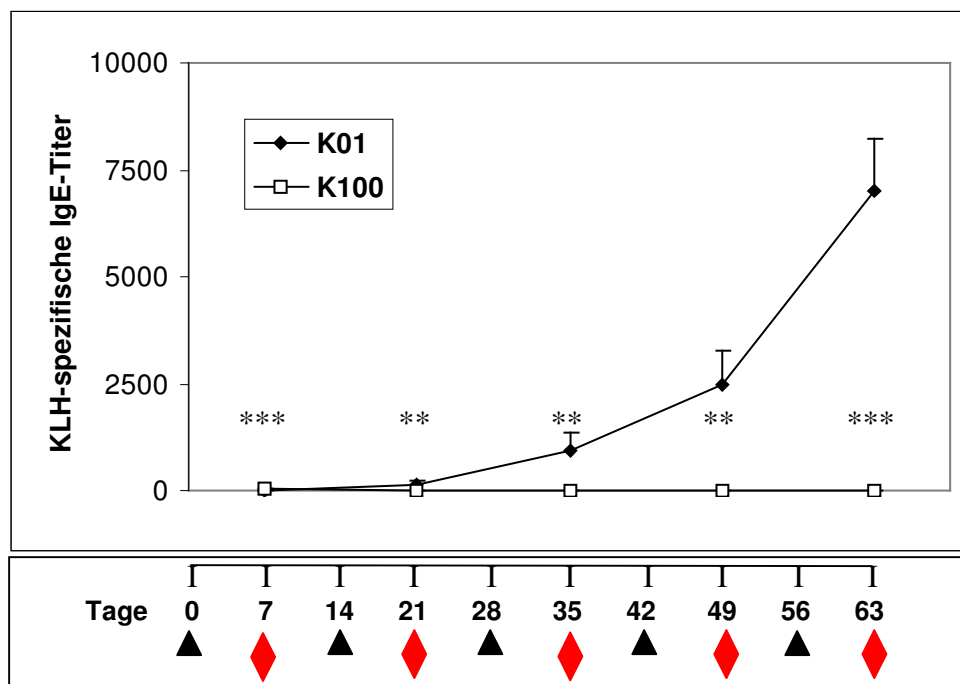


Abb. 3.2.1: Kinetik der IgE-Produktion

BALB/c-Mäuse ($n=4$) wurden repetitiv alle 14 Tage intraperitoneal mit 0,1 μg (K01, ◆) oder 100 μg KLH (K100, □) adsorbiert an Alum immunisiert. Eine Woche nach jeder Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen und die Menge der KLH-spezifischen IgE-Antikörper in den Seren wurde mittels ELISA bestimmt. Auf der Zeitachse sind die Zeitpunkte für die Immunisierungen (▲) und die Blutabnahmen (◆) dargestellt. Die Abbildung stellt die Mittelwerte \pm SD der IgE-Titer in den Mausseren dar. Signifikante Unterschiede zwischen den K01- und den K100-Mäusen sind mit Sternen gekennzeichnet (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Die Daten sind repräsentativ für alle im KLH-System durchgeführten Immunisierungen (mindestens 100 Tiere pro Gruppe).

Nach einer bis zwei Immunisierungen fand in beiden Gruppen zunächst nur eine geringe Induktion der IgE-Produktion statt. Während die Immunisierung mit niedrigen Dosen jedoch mit steigender Immunisierungsdauer eine starke IgE-Antwort induzierte, wurde in den Seren aus hochdosig immunisierten Mäusen auch nach fünf Immunisierungen kaum IgE detektiert (Abb. 3.2.1).

Mit dem ELISA-System konnte jedoch nicht sicher nachgewiesen werden, dass die extrem geringen Mengen detektierbaren IgEs in den K100-Seren tatsächlich auf eine IgE-Hypoproduktion der hochdosig immunisierten Mäuse zurückzuführen ist. Es bestünde auch die Möglichkeit eines Messfehlers bedingt durch konkurrierende Bindungen anderer, in größeren Mengen vorhandener Antikörperisotypen (IgG, IgM) an das plattengekoppelte Antigen. Um einen Messfehler im ELISA-System auszuschließen und nachzuweisen, dass tatsächlich eine antigendosisabhängige IgE-Regulation stattfindet, wurden RBL-Tests mit Seren aus K01- und K100-Mäusen durchgeführt. RBL (**R**at **B**asophilic **L**eukemia)-2H3-Zellen sind basophile Granulozyten aus der Ratte und besitzen wie die Mastzellen den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI. Werden die RBL-Zellen durch die Bindung von funktionell aktivem IgE an diesen Rezeptor und Kreuzvernetzung mit dem spezifischen Antigen aktiviert, degranulieren sie und schütten Mediatoren, u.a. β-Hexosaminidase aus. Im RBL-Test (2.2.6.13) macht man sich diesen Vorgang zunutze, um die Funktionalität von antigenspezifischem IgE in Seren nachzuweisen. Neben den zu testenden Seren aus K01- und K100-Mäusen wurden in dem RBL-Test verschiedene Kontrollen mitgeführt. Als Kontrolle für die Antigenpezifität des IgE dienten Seren aus naiven Mäusen. Außerdem wurden Zellen in den Test eingesetzt, die nicht mit Serum inkubiert wurden, um zu kontrollieren, ob es durch den Antigenstimulus allein zu einer Degranulation kommen kann. Anhand von RBL-2H3-Zellen, die unspezifisch mit A23187 und PMA stimuliert wurden, ließ sich die maximale Freisetzung von β-Hexosaminidase bestimmen.

Abbildung 3.2.2 zeigt die Ergebnisse aus den RBL-Tests. Unstimulierte Zellen zeigen eine Freisetzung von β-Hexosaminidase von ca. 5%. Die Zugabe von KLH führt bei Zellen, die ohne Serum oder mit Serum aus naiven Mäusen kultiviert wurden nicht zu einer verstärkten Freisetzung von β-Hexosaminidase. Die Inkubation mit K100-Seren führt zu einer nicht signifikanten Erhöhung der β-Hexosaminidasefreisetzung auf ca. 10%. Die Inkubation mit K01-Seren hingegen führt zu einer starken β-Hexosaminidasefreisetzung von über 30%, die signifikant über der durch naive Seren und auch der durch K100-Seren induzierten Freisetzung liegt.

Die Ergebnisse der RBL-Teste reflektieren somit die Daten aus den ELISA-Analysen. Nur nach Immunisierung mit niedrigen, nicht aber mit hohen Antigendosen kommt es zu einer starken Produktion von antigenspezifischen IgE-Antikörpern in Mäusen.

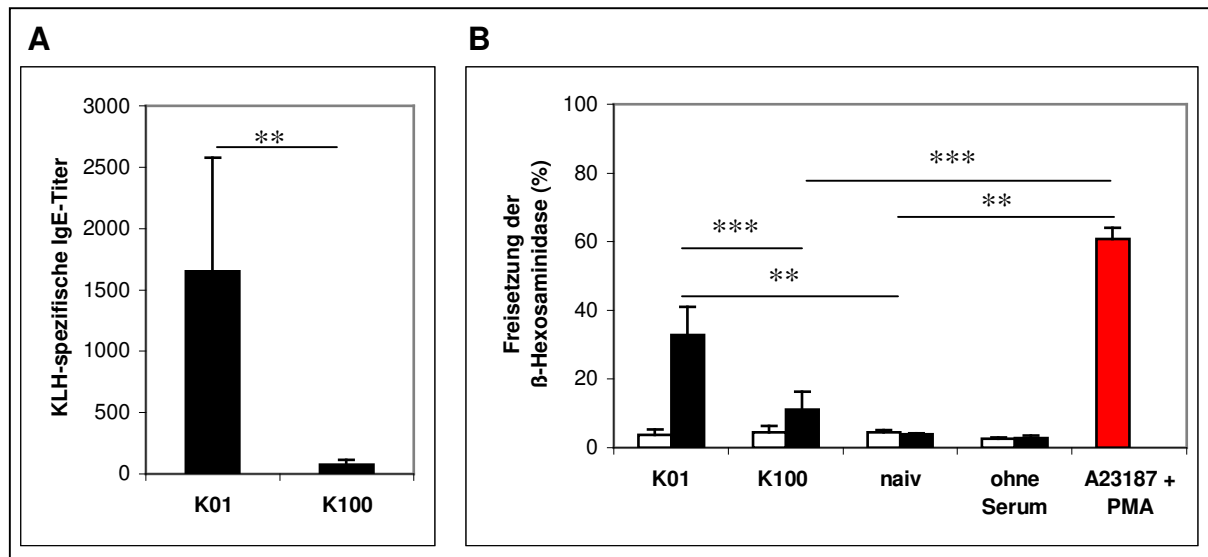


Abb. 3.2.2: Funktionsanalyse der IgE-Antikörper in K01- und K100-Seren

BALB/c-Mäuse (n=8) wurden repetitiv alle 14 Tage intraperitoneal mit 0,1 µg (K01) oder 100 µg KLH (K100) adsorbiert an Alum immunisiert. Nach der fünften Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und die Menge der KLH-spezifischen IgE-Antikörper in den Seren wurde mittels ELISA bestimmt (A). RBL-Zellen wurden mit Seren, die aus K01-, K100- bzw. naiven Mäusen gewonnen wurden, inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss durch Zugabe von 1 µg/ml KLH stimuliert (schwarze Balken) oder blieben unstimuliert (weiße Balken) und die Freisetzung der β-Hexosaminidase wurde bestimmt (B). Die maximale β-Hexosaminidasefreisetzung wurde durch Stimulation der Zellen mit A23187 + PMA bestimmt (B). Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte +/- SD der Messungen individueller Seren, die in zwei unabhängigen Versuchen gewonnen wurden. Die Symbole kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den mit Querbalken verbundenen Gruppen (** p < 0,01, *** p < 0,001).

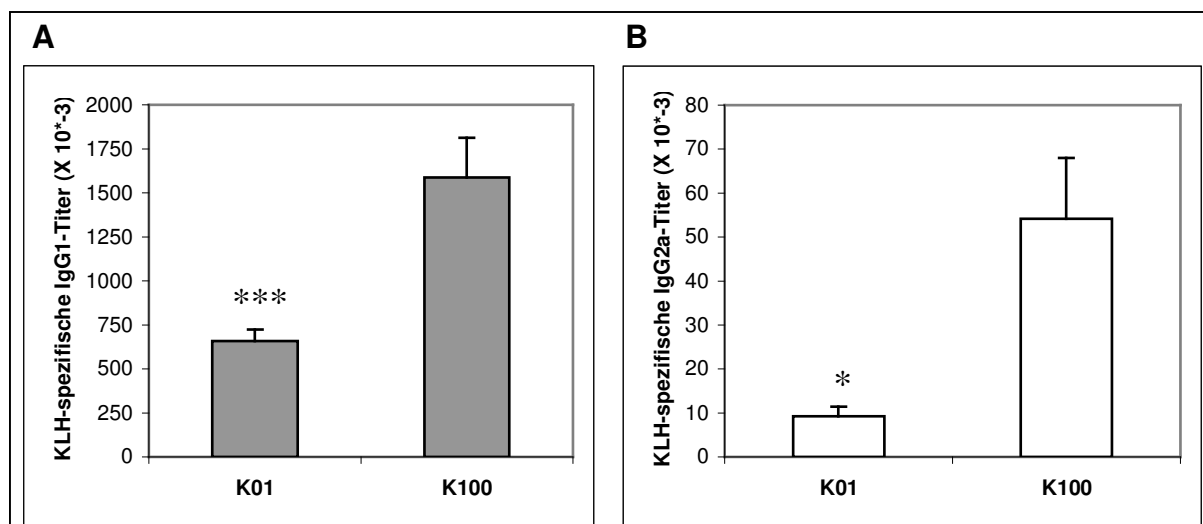


Abb. 3.2.3: Produktion spezifischer IgG-Antikörpersubklassen

BALB/c-Mäuse (n=4) wurden repetitiv alle 14 Tage intraperitoneal mit 0,1 µg (K01) oder 100 µg KLH (K100) adsorbiert an Alum immunisiert. Nach der fünften Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und die Mengen der KLH-spezifischen IgG1- (A) und IgG2a-Antikörper (B) in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung stellt die Mittelwerte +/- SD der Antikörpertiter in den Mausseren dar. Signifikante Unterschiede zwischen den K01- und den K100-Mäusen sind mit Sternen gekennzeichnet (* p < 0,05, *** p < 0,001). Die Daten sind repräsentativ für alle im KLH-System durchgeführten Immunisierungen (mindestens 100 Tiere pro Gruppe).

Nach der letzten Immunisierung wurden außerdem die KLH-spezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörper in den Mausseren gemessen (Abb. 3.2.3). Insgesamt war IgG1 der vorherrschende Isotyp in der KLH-spezifischen Antikörperantwort, wobei die IgG1-Produktion in den hochdosig immunisierten Mäusen signifikant höher als in den niedrigdosig immunisierten Tieren war. In der K01-Gruppe kam es nur zu einer schwachen Induktion von KLH-spezifischen IgG2a-Antikörpern. Auch die IgG2a-Produktion war in den K100-Mäusen signifikant höher als in den K01-Mäusen.

Um zu überprüfen, ob die antigendosisabhängige Regulation der IgE-Produktion auch nach Immunisierung mit anderen Protein-Antigenen auftritt, wurden BALB/cJ-Mäuse alle 2 Wochen mit verschiedenen Dosen (0,1 - 1000 µg) Ovalbumin (OVA) adsorbiert an Alum i.p. immunisiert. Nach der fünften Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen und die OVA-spezifischen Immunglobuline in den Seren wurden mittels ELISA nachgewiesen (Abb. 3.2.4).

Wie bei der Immunisierung mit KLH konnte auch mit der OVA-Immunisierung gezeigt werden, dass die IgE-Produktion mit zunehmenden Antigendosen abnimmt (Abb. 3.2.4 A). Die Immunisierung mit der niedrigsten getesteten OVA-Dosis (0,1 µg) lag jedoch bereits im suboptimalen Bereich, da die Versuchsmäuse nur sehr geringe Antikörpermengen produziert hatten. Die größten Unterschiede in der IgE-Produktion waren nach Immunisierung mit 1 µg und 1 mg OVA detektierbar.

Mit steigender OVA-Dosis nahm die Produktion antigenspezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörper zu (Abb. 3.2.4 B). Der vorherrschende Isotyp war das IgG1.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die antigendosisabhängige Regulation der IgE-Produktion sowohl nach Immunisierung mit KLH als auch mit OVA nachgewiesen werden konnte und somit unabhängig von einem bestimmten Antigen zu sein scheint.

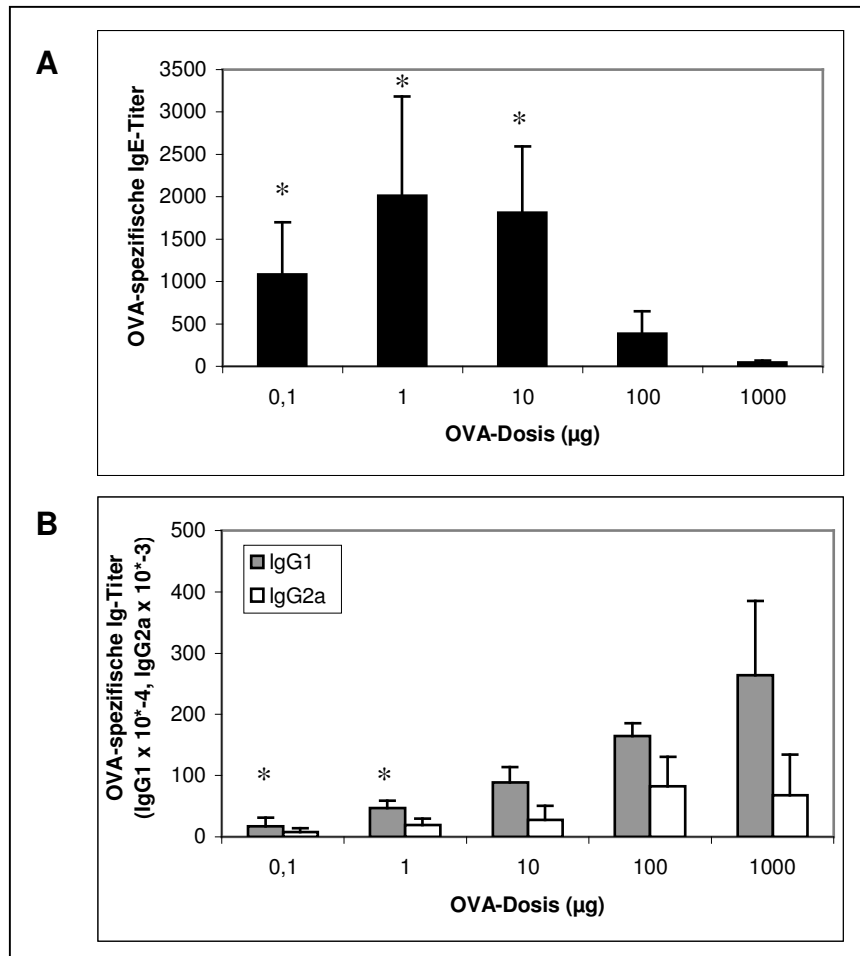


Abb. 3.2.4: Antigen-spezifische IgE, IgG1- und IgG2a-Produktion nach repetitiver i.p.-Immunisierung mit verschiedenen OVA-Dosen
BALB/c-Mäuse (n=4) wurden repetitiv alle 14 Tage i.p. mit den angegebenen OVA adsorbiert an Alum immunisiert. Nach der fünften Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und die OVA-spezifischen Ig-Titer (A: IgE, B: IgG1 und IgG2a) in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD der OVA-spezifischen Ig-Titer individueller Seren. Signifikante Unterschiede zwischen den mit 1 mg OVA immunisierten Mäusen und den niedrigerdosis immunisierten Tieren sind mit Sternen gekennzeichnet (* p < 0,05).

3.2.2 Untersuchung der Th2/Th1-Balance nach Immunisierung mit niedrigen und hohen Antigen-dosen

Ein Grund für die IgE-Suppression in den K100-Mäusen könnte eine starke Th1-Antwort sein. Aus den Analysen der antigenspezifischen Immunglobuline in den Seren geht hervor, dass in den hochdosig immunisierten Mäusen mehr IgG2a gebildet wurde als in den niedrigdosig immunisierten Tieren. IgG2a wird typischerweise bei einer Th1-polarisierten Immunantwort produziert. Zusammen mit

der niedrigen IgE-Produktion liegt die Vermutung nahe, dass in den K100-Mäusen eine eher Th1-gerichtete Immunantwort induziert wurde. Dagegen spricht jedoch, dass der vorherrschende Isotyp sowohl in den niedrig- als auch in den hochdosig immunisierten Mäusen IgG1 war, welcher wie IgE charakteristisch für Th2-Immunantworten ist.

Um die Möglichkeit einer verstärkten Induktion von Th1-Zellen zu untersuchen und die Polarisierung der Immunantwort in niedrig- und hochdosig immunisierten Mäusen zu charakterisieren, wurden Milzzellen von K01- und K100-Mäusen präpariert und für 72 Stunden mit und ohne den Zusatz von 1 $\mu\text{g/ml}$ KLH kultiviert. In den Kulturüberständen wurde dann die Sekretion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 (Th2) und IFN- γ (Th1) mittels Sandwich-ELISA nachgewiesen.

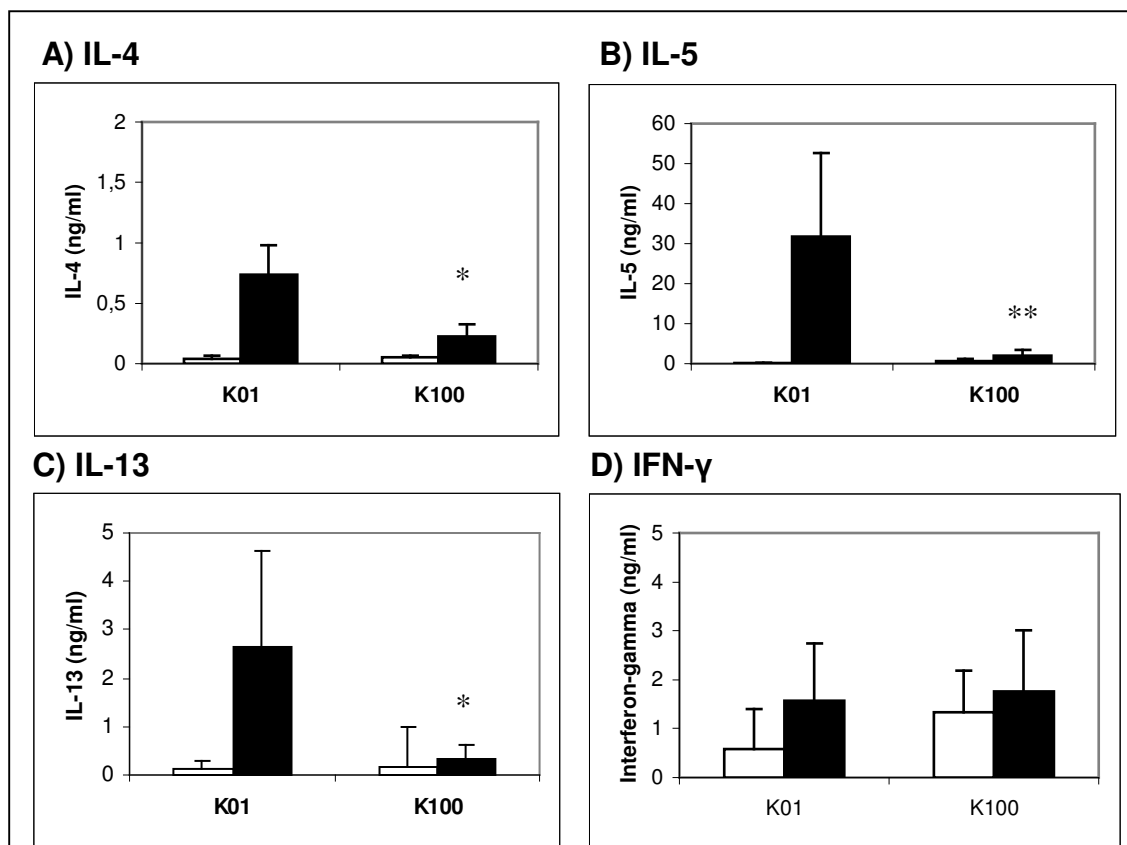


Abb. 3.2.5: Zytokinproduktion von Milzzellen nach Immunisierung mit K01 und K100

BALB/c-Mäuse ($n=2-5$) wurden repetitiv alle 14 Tage intraperitoneal mit 0,1 μg (K01) oder 100 μg KLH (K100) adsorbiert an Alum immunisiert. Nach der fünften Immunisierung wurden die Milzzellen präpariert und ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) 1 $\mu\text{g/ml}$ KLH kultiviert. Die Mengen der Zytokine IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C) und IFN- γ (D) in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus 3 bis 7 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Signifikante Unterschiede zwischen den K01- und K100-Mäusen sind mit Sternen gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

In den Milzzellkulturüberständen von K01-Mäusen war ein starke KLH-spezifische Th2-Zytokinproduktion (IL-4, IL-5, IL-13) messbar (Abb.3.2.5 A-C). Dagegen wurden nur moderate Mengen des antigenspezifisch sezernierten Th1-Zytokins IFN- γ detektiert. Das Zytokinmuster weist auf eine starke Induktion von Th2-Zellen in den K01-Mäusen hin. Dieses Ergebnis reflektiert auch die Analyse der Immunglobuline, bei der ebenfalls eine Th2-gerichtete Immunantwort durch die Messung großer Mengen KLH-spezifischer IgE- und IgG1-Antikörper nachgewiesen wurde.

Die Mengen der Th2-Zytokine in den Überständen von K100-Milzzellkulturen war verglichen mit denen in den K01-Milzzellkulturüberständen signifikant reduziert (Abb.3.2.5 A-C). Es fand jedoch auch keine KLH-spezifische IFN- γ -Produktion statt (Abb.3.2.5 D). In den K100-Mäusen scheint es daher nicht zu einer verstärkten Induktion von Th1-Zellen zu kommen. Ein inhibitorischer Effekt durch eine starke Th1-Antwort scheint also nicht der Grund für die reduzierte Produktion von Th2-Zytokinen und antigenspezifischen IgE-Antikörpern in den K100-Mäusen zu sein.

Um dieses Phänomen näher zu untersuchen wurde ein Experiment mit IL-12p40- und IFN- γ -KO-Mäusen, die den genetischen Hintergrund des C57BL/6-Inzuchtstammes aufweisen, durchgeführt. IL-12 und IFN- γ sind wichtige Zytokine, die die Entwicklung von Th1-Zellen regulieren. IL-12 ist für die Generierung von Th1-Zellen essentiell. IFN- γ wird von Th1-Zellen produziert und fördert deren Entwicklung und hemmt gleichzeitig die Entwicklung von Th2-Zellen. Ein Defekt in diesen Genen führt dazu, dass diese Mäuse keine funktionell aktiven Th1-Zellen bilden können.

Diese IL-12p40- und IFN- γ -KO-Mäuse wurden nach dem bereits beschriebenen Protokoll alle 14 Tage i.p. mit 0,1 μ g bzw. 100 μ g KLH adsorbiert an Alum immunisiert. Zur Kontrolle wurden Wildtypmäuse (C57BL/6) und BALB/cJ-Mäuse ebenfalls immunisiert. Eine Woche nach der fünften Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen und die KLH-spezifischen IgE-Mengen in den Seren wurden mittels ELISA gemessen.

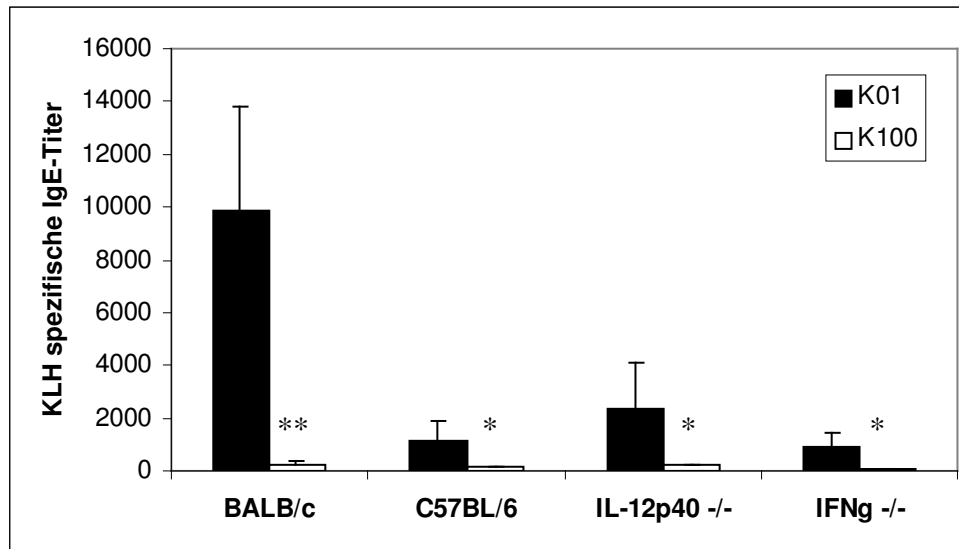


Abb. 3.2.6: Antigen dosisabhängige IgE-Produktion in verschiedenen Mausstämmen

Mäuse (n=4) der Inzuchtstämme BALB/cJ und C57Bl/6 sowie der Knock-out-Stämme IL-12p40^{-/-} und IFN- γ ^{-/-} wurden fünfmal im Abstand von je 14 Tagen mit 0,1 μ g (K01) bzw. 100 μ g KLH (K100) adsorbiert an Alum i.p. immunisiert. Im Anschluss wurden die Seren gewonnen und die KLH-spezifischen IgE-Antikörper im ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der KLH-spezifischen IgE-Titer individueller Seren. Signifikante Unterschiede zwischen K01- und K100-Mäusen sind durch Sterne gekennzeichnet (* p < 0,05, ** p < 0,01).

In Abbildung 3.2.6 ist die IgE-Antwort der verschiedenen Mausstämmen nach Immunisierung mit niedrigen bzw. hohen KLH-Dosen dargestellt. Zunächst fällt auf, dass C57BL/6-Mäuse nach Immunisierung mit der niedrigen Antigen dosis viel geringere IgE-Antikörpermengen produzierten als BALB/cJ-Mäuse. Seren aus immunisierten BALB/cJ-Mäusen zeigten die typische antigen dosisabhängige IgE-Regulation. K01-Mäuse produzierten sehr große Mengen KLH-spezifisches IgE, während in K100-Mausseren kaum IgE nachweisbar war. Trotz der geringeren K01-induzierten IgE-Produktion fand jedoch auch in C57BL/6-Mäusen die antigen dosisabhängige IgE-Regulation statt. Die KLH-spezifische IgE-Produktion in den Knock-out-Stämmen IL-12p40^{-/-} und IFN- γ ^{-/-} war mit der von C57BL/6-Mäusen vergleichbar. In diesen Mausstämmen wurde demnach bei niedrigdosiger Immunisierung wesentlich mehr antigenspezifisches IgE produziert als nach hochdosiger Immunisierung. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass nicht die verstärkte Induktion von Th1-Zellen für die ausgeprägte Suppression der IgE-Produktion nach Immunisierung mit hohen Antigen dosen verantwortlich ist, da diese in den Knock-out-Mäusen nicht generiert werden.

3.2.3 Untersuchungen zur phänotypischen Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen nach Immunisierung mit niedrigen bzw. hohen Antigen Dosen

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die antigendosisabhängige IgE-Regulation ist die verstärkte Aktivierung oder Induktion von regulatorischen T-Zellen (Treg) in hochdosig immunisierten Mäusen. Es sind verschiedene Oberflächenmoleküle, Zytokine und Transkriptionsfaktoren bekannt, deren Expression mit dem Phänotyp bzw. der Funktion von Treg assoziiert ist.

Natürliche Treg (nTreg) umfassen in Mäusen und Menschen 5-10% der peripheren CD4⁺ T-Zellen. Sie tragen zum Erhalt der peripheren Toleranz bei und schützen vor Autoimmunkrankheiten, indem sie Immunantworten auf Autoantigene supprimieren [Sakaguchi et al. 1995, Maloy und Powrie 2001, Sakaguchi 2004]. nTreg sind CD4⁺ und CD25⁺ und exprimieren außerdem auf ihrer Oberfläche CTLA-4 und GITR [Jonuleit et al. 2001, Sakaguchi 2004, Shimizu et al. 2002]. Des Weiteren ist der Transkriptionsfaktor Foxp3 spezifisch für murine nTreg. Foxp3 ist essentiell für die Entwicklung und Funktion von nTreg [Hori et al. 2003, Fontenot et al. 2003].

Neben den nTreg, die einen zell-zell-kontakt-abhängigen Suppressionsmechanismus nutzen, gibt es auch induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg) die über IL-10- oder TGF- β -vermittelte Suppressormechanismen agieren [Groux et al. 1997, Annacker et al. 2001, Satoguina et al. 2005, Zhao et al. 2006]. Tr1-Zellen sind induzierte CD4⁺ regulatorische T-Zellen in Maus und Mensch, die ihre Zielzellen durch die Sekretion des immunregulatorischen Zytokins IL-10 supprimieren [Gregori et al. 2007]. Diese Zellen sind bei der Kontrolle verschiedener Autoimmunkrankheiten [Groux et al. 1997, Wildbaum et al. 2002] und bei der Transplantattoleranz [Bacchetta et al. 1994] von Bedeutung und werden außerdem durch bestimmte Tumorarten und Krankheitserreger induziert, die ein immunsuppressives Mikromilieu um sich schaffen und die Produktion von IL-10 fördern [Akasaki et al. 2004, Bergmann et al. 2007, Rouse und Suavas et al. 2007, Oderda et al. 2007]. Th3-Zellen sind TGF β -sezernierende CD4⁺ T-Zellen mit suppressiven Effekten auf Th1-Zellen und andere Immunzellen. Th3-Zellen haben eine regulatorische Funktion bei der Kontrolle verschiedener Autoimmunkrankheiten [Chen et al. 1998, Seddon und Mason et al. 1999, Weiner 2001] und bei der Allotransplantattoleranz [Josien et al. 1998]. Th3-Zellen vermitteln außerdem die

antigenspezifische „Hyporesponsiveness“ von Immunzellen bei einer chronischen Helmintheninfektion [Doetze et al. 2000].

Ein weiterer Typ regulatorischer T-Zellen exprimiert CD8, ist aber negativ für das kostimulatorische Molekül CD28. Diese CD8⁺ Suppressor-T-Zellen spielen in vielen Bereichen eine Rolle: Suppression der Antikörperantwort auf lösliche und zellassoziierte Antigene und der Antwort gegen Superantigene, Suppression von Autoimmunerkrankungen, Inhibition von Transplantationskomplikationen wie „graft-versus-host disease“ (GVHD) und Transplantatabstoßung sowie von virusinduziertem Asthma und bei der Entwicklung oraler Toleranz [Vukmanovic-Stejic et al. 2001, Chitnis et al. 2001, Sun et al. 1988, Zhang et al. 1993, Douillard et al. 1996, Chen et al. 1994, Chen et al. 1995]. Verschiedene Effektoormechanismen kommen in Frage: direkte Lyse oder Apoptoseinduktion führen zum Abtöten der Zielzellen. Des Weiteren können CD8⁺ Suppressor-T-Zellen die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen direkt oder durch die Modifikation der APC indirekt supprimieren. Diese Suppressormechanismen werden u.a. durch die Produktion von immunregulatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGFβ vermittelt [Vukmanovic-Stejic et al. 2001].

Des Weiteren haben γδ-T-Zellen in verschiedenen suppressiven Systemen eine regulatorische Funktion: bei der Inhibition von Autoimmunerkrankungen [Cardillo et al. 1993, Harrison et al. 1996], bei der Transplantattoleranz [Gorczyński 1994] und der Suppression der Anti-Tumor-Antwort [Seo und Egawa 1995] und bei der Suppression der IgE-Produktion und der T-Zellantwort in einem murinen Allergiemodell [McMenamin et al. 1994].

Zunächst wurden Durchflusszytometrie-Analysen von Milz- und Lymphknotenzellen durchgeführt, die aus hoch- und niedrigdosig immunisierten Mäusen isoliert wurden. Die Expression von CD4, CD25 und CTLA-4 bzw. GITR sowie von CD8 und CD28 wurde analysiert. Weiterhin wurde die Expression des γδ-TCR und der Oberflächenmoleküle CD4 bzw. CD8 bestimmt.

Abbildung 3.2.7 (A: Milzzellen, B: Lymphknotenzellen) stellt den Anteil der Lymphozyten dar, die die genannten Oberflächenmoleküle exprimieren. Der Anteil CD4⁺CD25⁺ Zellen umfasst bei Milzzellen ca. 4-5% und bei Lymphknotenzellen ca. 8% der Lymphozyten. Ca. 2% der Lymphozyten aus Milz- und Lymphknotenzellen exprimieren CD4, CD25 und CTLA-4. Bei Milzzellen exprimieren ca. 3% und bei Lymphknotenzellen ca. 6% der Lymphozyten die

Oberflächenmoleküle CD4, CD25 und GITR. Mit den Durchflusszytometrie-Analysen der Oberflächenmoleküle, die mit dem Phänotyp von nTreg assoziiert sind, konnten keine signifikanten Unterschiede auf Milz- oder Lymphknotenzellen von K01- und K100-Mäusen nachgewiesen werden.

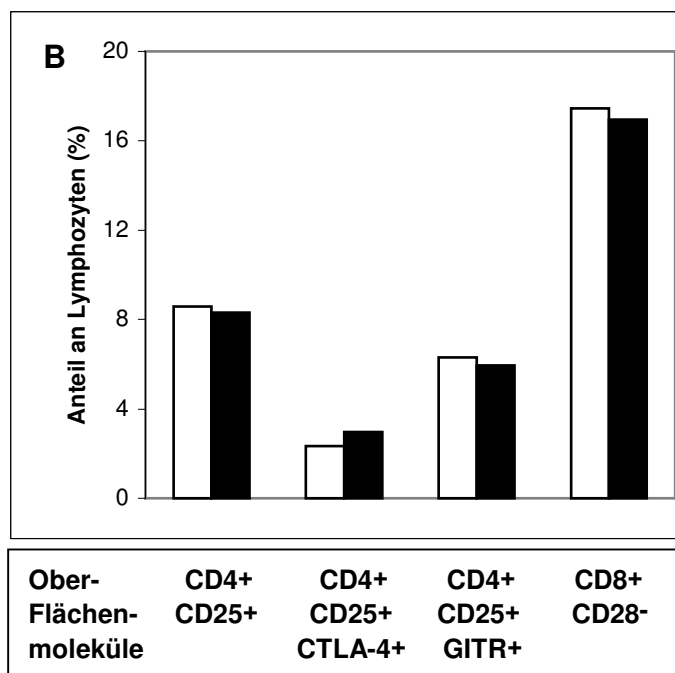
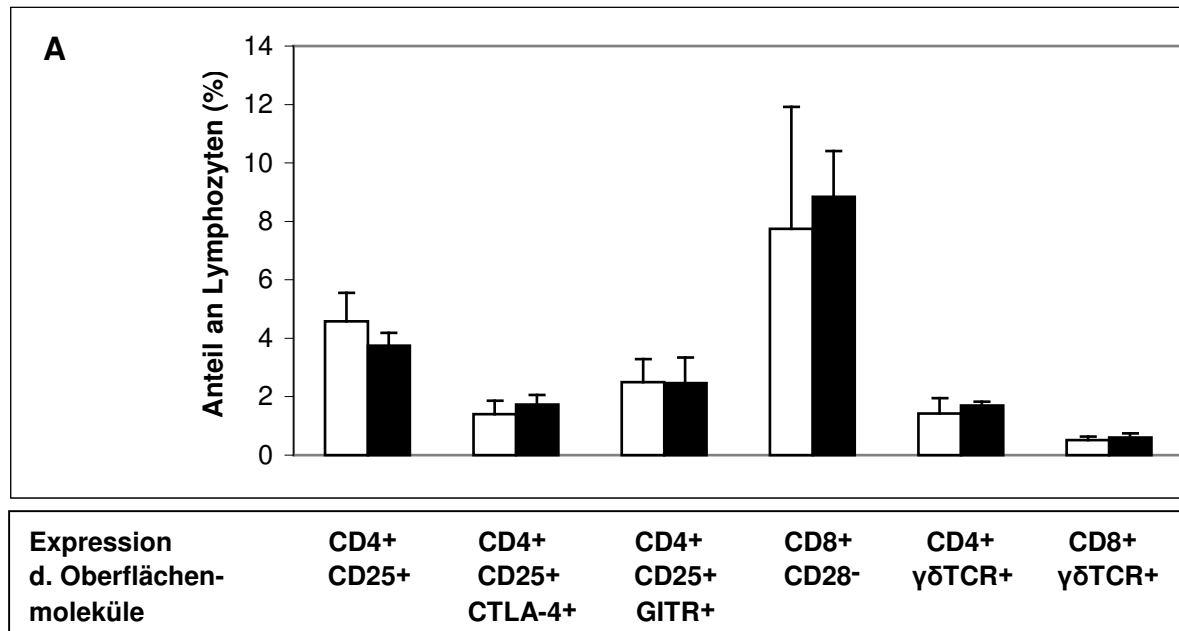


Abb. 3.2.7: Expression von Oberflächenmolekülen auf Milz- und Lymphknotenzellen von niedrig- und hochdosig immunisierten Mäusen

BALB/c-Mäuse wurden repetitiv alle 14 Tage intraperitoneal mit 0,1 μ g (K01, weiße Balken) oder 100 μ g KLH (K100, schwarze Balken) adsorbiert an Alum immunisiert. Nach der fünften Immunisierung wurden die Milz- (A) und Lymphknotenzellen (B) isoliert und mittels FACS-Analyse wurde der Anteil der Lymphozyten bestimmt, der die angegebenen Oberflächenmoleküle exprimiert. A) Die Darstellung zeigt die Mittelwerte \pm SD aus vier Versuchen mit 2 bis 10 Mäusen pro Präparation. B) Die Darstellung zeigt repräsentativ für zwei Versuche mit zwei Mäusen pro Präparation den Anteil der marker-exprimierenden Lymphozyten.

Der Anteil $CD8^+CD28^-$ Zellen umfasst bei Milzzellen ca. 9% und bei Lymphknotenzellen ca. 18% der Lymphozyten (Abb. 3.2.7). Auch bei der durchflusszytometrischen Analyse der $CD8^+CD28^-$ Suppressorzellen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen K01- und K100-Milz- oder Lymphknotenzellen nachgewiesen werden.

In den Milzzellen wurden außerdem $\gamma\delta$ -TCR⁺ Zellen nachgewiesen (Abb. 3.2.7 A). CD4⁺ $\gamma\delta$ -TCR⁺ Zellen umfassten ca. 2%, CD8⁺ $\gamma\delta$ -TCR⁺ Zellen ca. 1% der Lymphozyten. Die Unterschiede zwischen K01- und K100-Milzzellen waren jedoch nicht signifikant.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass mit den Durchflusszytometrie-Analysen keine signifikanten Unterschiede in der Expression von typischen Treg-assoziierten Oberflächenmolekülen auf Milz- oder Lymphknotenzellen von K01- und K100-Mäusen nachgewiesen werden konnten.

Die mRNA-Expression der Zytokine IL-10 und TGF β sowie des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 wurde mittels quantitativer Realtime-PCR bestimmt. Dazu wurden frisch präparierte Milzzellen aus K01- und K100-Mäusen 72 Stunden mit KLH stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet, die mRNA isoliert und mittels Reverser Transkription cDNA hergestellt. Diese wurde in die Realtime-PCR eingesetzt (Abb. 3.2.8 A). In weiteren Versuchen wurden aus den Milzzellen nach der Kultivierung mit KLH CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mittels MACS-Isolation aufgereinigt. Die cDNA aus diesen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurde ebenfalls in Realtime-PCRs eingesetzt (Abb. 3.2.8 B).

Weder in den Milzzellen noch in den aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen konnten signifikante Unterschiede in der Expression von TGF β - oder Foxp3-mRNA detektiert werden. In den K01-Milzzellen war die IL-10-mRNA-Expression gegenüber der Expression in den K100-Milzzellen signifikant erhöht. Tr1-Zellen supprimieren zwar ihre Zielzellen durch die Sekretion von IL-10 [Gregori et al. 2007], IL-10 steht jedoch auch in engem Zusammenhang mit Th2-polarisierten Immunantworten. Es wird von Th2-Zellen produziert und steigert Th2-Antworten [Moore et al. 2001]. Die starke IL-10-Produktion in den K01-Mäusen kann daher auch durch die starke Th2-Polarisierung hervorgerufen worden sein (siehe auch Abb. 3.2.5, Messung von Th2- und Th1-Zytokinen in Milzzellkulturüberständen).

In den aufgereinigten K01-CD8⁺ T-Zellen war die IL-10-mRNA-Expression ca. doppelt so stark wie in den K100-CD8⁺ T-Zellen. Die TGF β -mRNA-Expression war hingegen in den K100-CD8⁺ T-Zellen leicht erhöht. Da die mRNA-Expression in aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen jedoch nur einmal gemessen wurde, lassen sich keine Aussagen über die Signifikanz dieser Ergebnisse treffen.

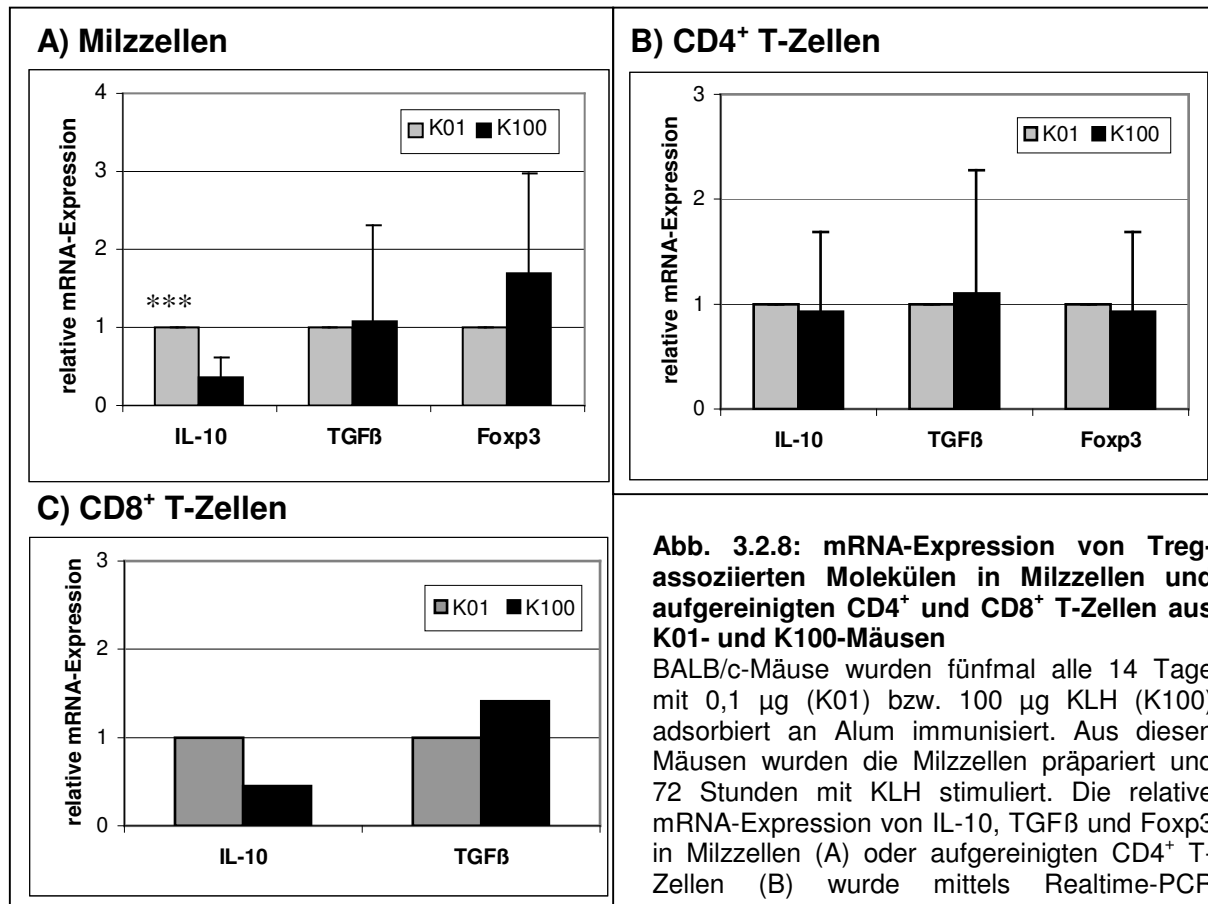


Abb. 3.2.8: mRNA-Expression von Treg-assoziierten Molekülen in Milzzellen und aufgereinigten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus K01- und K100-Mäusen

BALB/c-Mäuse wurden fünfmal alle 14 Tage mit 0,1 µg (K01) bzw. 100 µg KLH (K100) adsorbiert an Alum immunisiert. Aus diesen Mäusen wurden die Milzzellen präpariert und 72 Stunden mit KLH stimuliert. Die relative mRNA-Expression von IL-10, TGFβ und Foxp3 in Milzzellen (A) oder aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen (B) wurde mittels Realtime-PCR bestimmt. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte

+/- SD von sechs unabhängigen Versuchen mit je 2-10 Mäusen pro Präparation (A) bzw. 2 unabhängigen Versuchen mit je 2 Mäusen pro Präparation (B). Signifikante Unterschiede zwischen K01 und K100-Mäusen sind durch Sterne gekennzeichnet (***) $p < 0,001$). Die relative mRNA-Expression von IL-10 und TGFβ in aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen wurde ebenfalls mittels Realtime-PCR bestimmt (C). Die Darstellung zeigt die relative mRNA-Expression in CD8⁺ T-Zellen aus einer Präparation mit 2 Tieren.

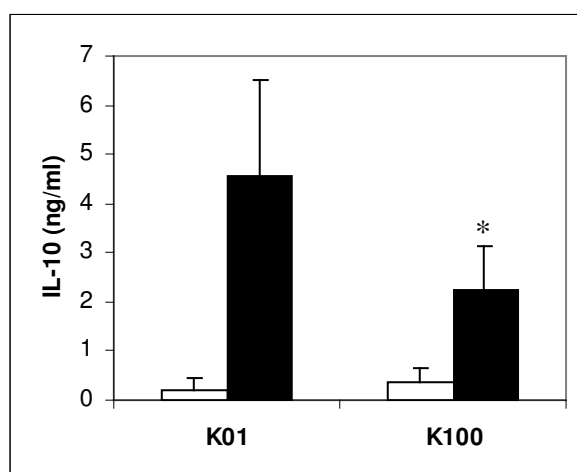


Abb. 3.2.9: IL-10-Produktion durch Milzzellen aus K01- und K100-Mäusen

BALB/c-Mäuse wurden fünfmal alle 14 Tage i.p. mit 0,1 µg (K01) bzw. 100 µg KLH (K100) adsorbiert an Alum immunisiert. Aus diesen Mäusen wurden die Milzzellen präpariert und 72 Stunden ohne (weiße Balken) und mit 1 µg/ml KLH (schwarze Balken) kultiviert und die IL-10-Konzentration in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte +/- SD der IL-10-Produktion von K01- und K100-Milzzellen aus 7 Experimenten à 2-5 Tiere pro Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen K01 und K100-Mäusen sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$).

Die gesteigerte IL-10-Produktion durch stimulierte K01-Milzzellen wurde auch auf Proteinebene bestätigt. Dazu wurde IL-10 in den Überständen von Milzzellkulturen mittels ELISA gemessen (Abb. 3.2.9). In Übereinstimmung mit den mRNA-Daten war

die IL-10-Produktion in den K01-Milzzellen gegenüber den K100-Milzzellen signifikant erhöht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in K100- versus K01-Milz- und Lymphknotenzellen keine signifikanten Expressionsunterschiede von typischen Oberflächenmolekülen, Zytokinen und Transkriptionsfaktoren, die mit einem Phänotyp konventioneller Treg-Populationen assoziiert sind, nachweisbar sind.

3.2.4 *In vitro*-Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen nach Immunisierung mit niedrigen bzw. hohen Antigendosen

Regulatorische T-Zellen sind hypoproliferativ und supprimieren die Proliferation von Effektor-T-Zellen in der Kokultur. Um zu untersuchen, ob durch die hochdosierte Immunisierung regulatorische T-Zellen gebildet wurden, wurden Kulturen von Milz- und Lymphknotenzellen, die aus K100- und K01-Mäusen isoliert wurden, angesetzt. Nach 72 Stunden Stimulation dieser Zellen mit verschiedenen KLH-Konzentrationen wurde deren Proliferation durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen.

Regulatorische T-Zellen supprimieren ihre Nachbarzellen zum Teil über Zell-Zell-Kontakt. Für diese Art der Suppression ist es notwendig, dass die Zellen in der Kultur nah beieinander sitzen, um in direkten Kontakt treten zu können. Bei einer Suppression mittels löslicher Faktoren können Treg und Zielzellen über größere Distanzen miteinander kommunizieren. Es wurden daher Zellkulturen mit verschiedenen Zelldichten angesetzt.

K01-Milzzellen proliferierten sehr stark nach Stimulation mit KLH (Abb. 3.2.10 A + B). Die Proliferationsstärke war abhängig von der KLH-Konzentration im Test. Auch bei niedrigen Zelldichten fand eine starke antigenabhängige Proliferation statt. Im Gegensatz dazu war die Proliferationsstärke der K100-Milzzellen abhängig von der Zelldichte. Während sie, in geringer Zelldichte ausgesät, fast genau so stark wie die K01-Milzzellen proliferierten (Abb. 3.2.10 A), war die Proliferation der K100-Milzzellen in Kulturen mit hoher Zelldichte signifikant niedriger (Abb. 3.10 B).

In den Lymphknotenzellkulturen von K100-Zellen wurde eine solche von der Zelldichte abhängige Hypoproliferation nicht festgestellt (Abb. 3.2.10 C + D). Bei Stimulation mit geringen KLH-Konzentrationen proliferierten K100-Lymphknotenzellen in der Kultur mit der hohen Zelldichte (Abb. 3.2.10 D) zwar etwas weniger als K01-Lymphknotenzellen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

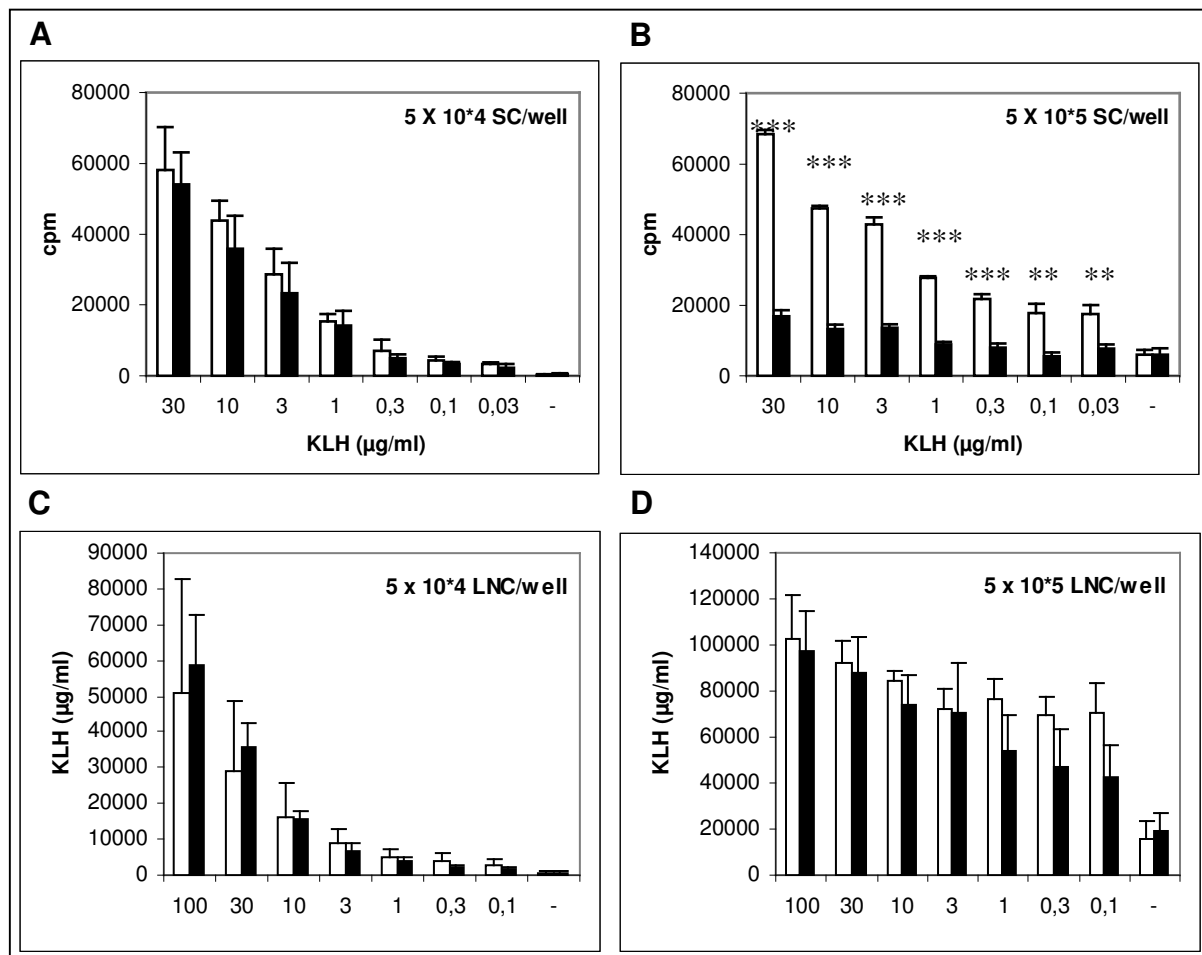


Abb. 3.2.10: Proliferation von K01- und K100-Milz- und Lymphknotenzellen

BALB/c-Mäuse wurden fünfmal alle 14 Tage i.p. mit 0,1 µg (K01, weiße Balken) bzw. 100 µg KLH (K100, schwarze Balken) adsorbiert an Alum immunisiert. Milz- (A + B) und Lymphknotenzellen (C + D) aus diesen Mäusen wurden in verschiedenen Zelldichten (A + C: 5 x 10⁴, B + D: 5 x 10⁵ Zellen pro Vertiefung) auf einer 96-Loch-Kulturplatte mit den angegebenen KLH-Konzentrationen restimuliert und die Proliferation wurde durch den Einbau von 3H-Thymidin bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD von Triplikaten. Die Daten sind repräsentativ für vier unabhängig durchgeführte Versuche zur Analyse der zell-dichte-abhängigen Proliferation. Signifikante Unterschiede zwischen der K01- und der K100-Zellproliferation sind mit Sternen gekennzeichnet (** p < 0,01, *** p < 0,001).

Die Hypoproliferation in den K100-Milz Zellkulturen implizierte das Vorhandensein von Treg. Um herauszufinden, ob potenzielle Treg unter den K100-Milz Zellen auch die Proliferation von K01-Milz Zellen inhibieren können, wurden *in vitro* Suppressionstests durchgeführt. Zu einer festgelegten Anzahl von K01-Milz Zellen wurden verschiedene Anzahlen K100-Milz Zellen bzw. zur Kontrolle Milz Zellen aus naiven Mäusen titriert.

Außerdem wurden Kulturen von K01- und K100-Milzzellen allein in den Anfangszellzahlen und der doppelten Zellzahl angesetzt. Diese dienten der Kontrolle der Proliferationsstärke von K01- und K100-Milzzellen ohne den Einfluss der kokultivierten Zellen. Zudem wurde so der Einfluss der Zelldichte in den Kulturen auf die Proliferationsstärke der Milzzellen bestimmt. Die Kulturen wurden mit drei verschiedenen KLH-Konzentrationen stimuliert und die Proliferation der Kokulturen wurde bestimmt (Abb. 3.2.11).

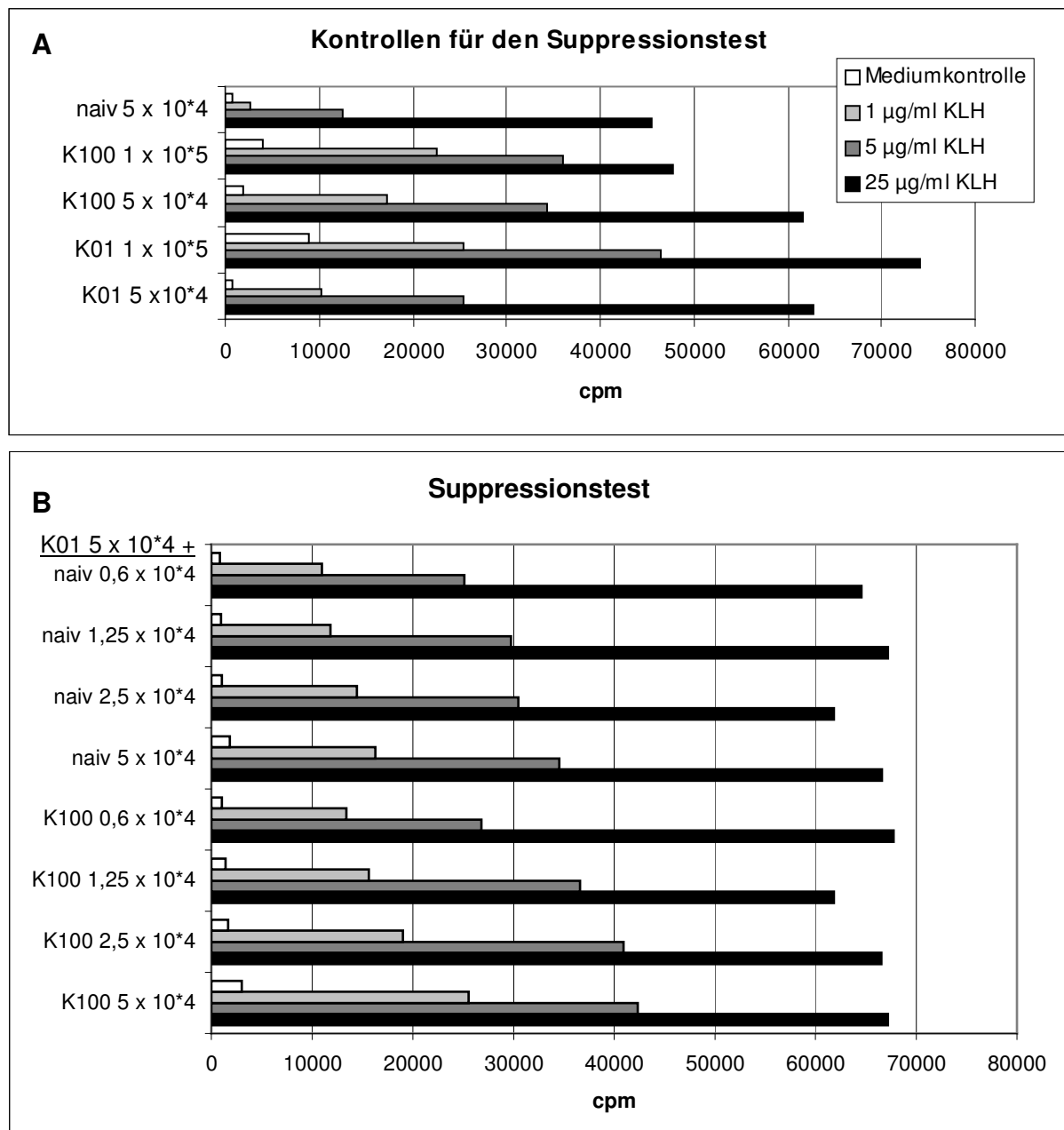


Abb. 3.2.11: Messung der suppressiven Kapazität potenzieller Treg unter den K100-Milzzellen in Kokulturen

5×10^4 K01-Milzzellen wurden mit den angegebenen Zahlen an Milzzellen aus K100-Mäusen bzw. naiven Mäusen kokultiviert und mit unterschiedlichen KLH-Konzentrationen (\square 0, \blacksquare 1, \blacksquare 5, \blacksquare 25 µg/ml) restimuliert. Die Proliferation wurde durch den Einbau von 3H-Thymidin bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von Triplikaten. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Suppressionstests.

K100-Milzzellen konnten die Proliferation von K01-Milzzellen in der Kokultur nicht supprimieren (Abb. 3.2.11). Es waren keine signifikanten Proliferationsunterschiede zwischen den einzelnen Kokulturansätzen und den Kontrollkulturen nachweisbar. Auffallend war die hohe Proliferation der naiven Milzzellen. Es wurden drei Suppressionstests dieser Art durchgeführt, die alle zu vergleichbaren Ergebnissen führten. Möglicherweise ist die Proliferationskapazität von aktivierten K01-Milzzellen zu stark, um reguliert zu werden.

Trotz des Unvermögens der K100-Milzzellen, die Proliferation von K01-Milzzellen in der Kokultur zu supprimieren, legt die zelllichteabhängige Hypoproliferation in den K100-Milzzellkulturen das Vorhandensein von regulatorischen Zellen nahe.

3.2.5 *In vivo*-Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung von Treg nach Immunisierung mit hohen Antigendosen

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.2 haben gezeigt, dass die antigendosisabhängige IgE-Regulation nicht auf einem Th1-Effekt beruht. Um die Möglichkeit zu untersuchen, dass regulatorische T-Zellen für die Suppression der IgE-Produktion in hochdosig immunisierten Mäusen verantwortlich sind, wurden die unter 3.2.3 und 3.2.4 beschriebenen Expressionsanalysen von Treg-Markern und Proliferationsteste durchgeführt. Diese *in vitro*-Untersuchungen lieferten keine Hinweise auf konventionelle Treg. Das Fehlen von Unterschieden in der Expression der typischen Treg-Marker schließt jedoch nicht das Vorhandensein nicht-klassischer Treg in den hochdosig immunisierten Mäusen aus. Außerdem ist die Regulation der T-Zellproliferation nicht mit der Regulation der IgE-Produktion gleichzusetzen. Es ist durchaus möglich, dass *in vivo* Treg aktiv sind, die die antigendosisabhängige IgE-Produktion in Mäusen regulieren, die aber *in vitro* nicht die Proliferation der K01-Milzzellen supprimieren können.

Im nächsten Schritt wurden daher *in vivo*-Versuche durchgeführt, um eine potenziell vorhandene regulatorische Zellpopulation zu identifizieren und zu charakterisieren. Wenn bei der Immunisierung mit hohen Antigendosen eine regulatorische Zellpopulation induziert wird, die die IgE-Produktion supprimiert, sollte der regulatorische Effekt durch Zelltransfer auf andere Individuen übertragbar sein. Um die Transferierbarkeit der IgE-Regulation zu testen, wurden verschiedene

Transferversuche durchgeführt (siehe Abb. 3.2.12). Dazu wurden zunächst Milzzellen aus hochdosig immunisierten Mäusen, die sehr wenige antigenspezifische IgE-Antikörper produzierten, isoliert und intravenös in naive Mäuse transferiert. Die Rezipienten wurden im folgenden mit niedrigen Antigendosen immunisiert und deren IgE-Titer wurden mit denen von Mäusen verglichen, die ohne vorhergehenden Transfer mit niedrigen Antigendosen immunisiert wurden und die somit die Positivkontrolltiere darstellen, in denen eine hohe IgE-Produktion induziert wird. Eine weitere Gruppe, die keinen Zelltransfer bekommen hatte, wurde mit der hohen Antigendosis immunisiert und diente als Vergleichsgruppe, um zu bemessen, wie stark die IgE-Inhibition in den Rezipienten ist. Um zu garantieren, dass nicht allein durch den Zelltransfer eine IgE-Inhibition erfolgt, wurden auch Milzzellen aus niedrigdosig immunisierten Mäusen transferiert.

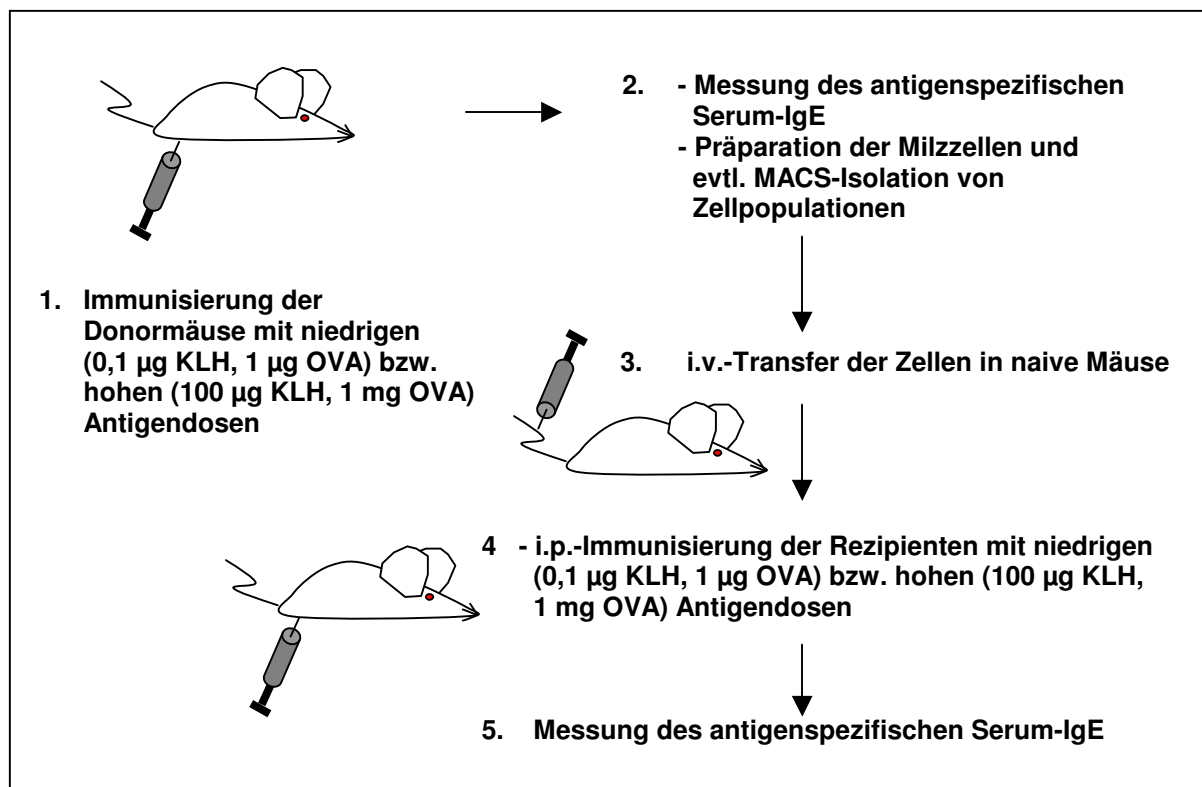


Abb. 3.2.12: Versuchsschema für die Transferexperimente

Das Schema zeigt die Vorgehensweise bei den Transferexperimenten. Zunächst wurden Donormäuse mit hohen bzw. niedrigen Antigendosen immunisiert und die antigenspezifischen IgE-Titer in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt. Die Donormilzzellen wurden nun isoliert und i.v. in naive Rezipienten transferiert. Zum Teil wurden auch Milzzellpopulationen aufgereinigt und transferiert. Die Rezipienten und Kontrollmäuse wurden nun entsprechend immunisiert und die IgE-Titer in den Seren wieder mittels ELISA bestimmt.

Abbildung 3.2.13 A zeigt den IgE-Status der Donormäuse. Die Immunisierung der Rezipienten und der Kontrolltiere begann zwei Tage nach dem Transfer und erfolgte im 14-tägigen Abstand. Eine Woche nach der fünften Immunisierung wurde den

Mäusen Blut entnommen und die KLH-spezifischen IgE-Mengen in den Seren wurden mittels ELISA gemessen (Abb. 3.2.13 B).

Die Transferexperimente zeigen, dass die durch Immunisierung mit niedrigen KLH-Dosen induzierte IgE-Produktion in den Rezipienten von K100-Milzzellen fast vollständig (95%) supprimiert war. Im Gegensatz dazu konnte der Transfer von K01-Milzzellen die IgE-Produktion nicht signifikant beeinflussen. In den Milzzellen von hochdosig immunisierten Mäusen scheint also eine Population regulatorischer Zellen vorhanden zu sein, die die IgE-Produktion supprimiert.

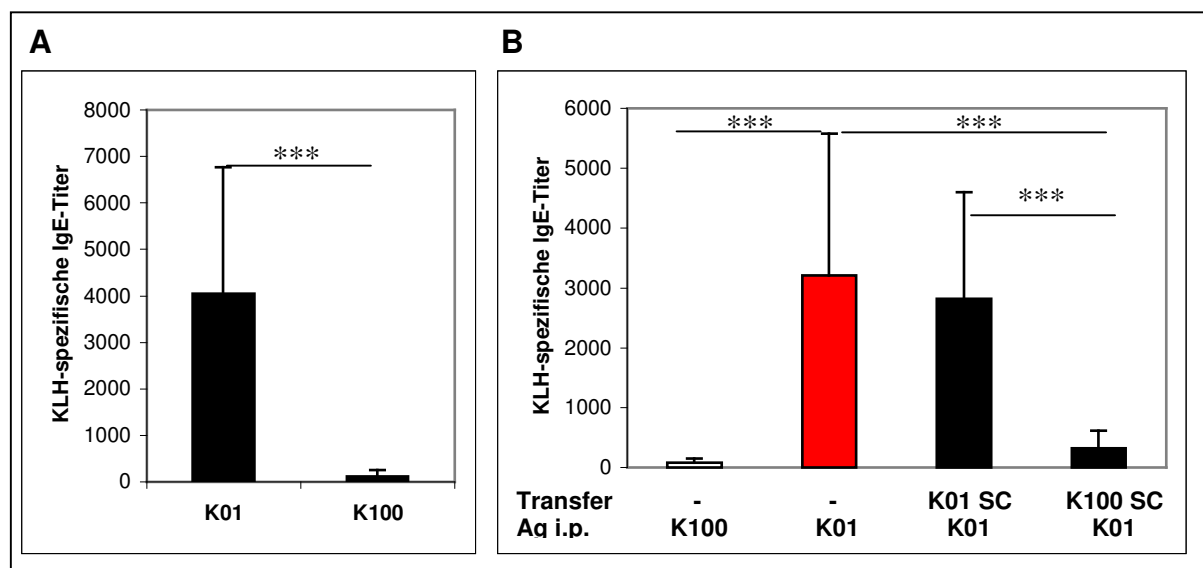


Abb. 3.2.13: IgE-Produktion nach Transfer von K01- und K100-Milzzellen

A) Milzzellen (SC) aus K100- und K01-Donoren wurden in naive Rezipienten (n=4) transferiert. B) Nach Immunisierung der Rezipienten (schwarz) und der Kontrollmäuse (weiß und rot) mit den angegebenen Antigen Dosen wurde den Mäusen Blut entnommen und die KLH-spezifischen IgE-Mengen in den Seren bestimmt. In der Abbildung sind die Mittelwerte \pm SD der IgE-Titer individueller Seren von vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit Sternen gekennzeichnet (***) p < 0,001).

In einem Transferversuch mit OVA als Antigen wurden die Ergebnisse der Transferversuche mit KLH als Antigen bestätigt (siehe Abb. 3.2.14). Milzzellen aus hochdosig (1 mg OVA adsorbiert an Alum, O 1000) und niedrigdosig (1 μ g OVA adsorbiert an Alum, O 1) immunisierten Mäusen wurden präpariert und intravenös in naive Mäuse transferiert. Die Rezipienten wurden im folgenden mit 1 μ g OVA adsorbiert an Alum immunisiert. Kontrollmäuse, denen keine Zellen transferiert wurden, wurden ebenfalls mit niedrigen und hohen Antigen Dosen immunisiert. Auch in diesem Versuch zeigten die Rezipienten von Milzzellen aus hochdosig immunisierten Mäusen eine signifikante Inhibition der IgE-Produktion, während Milzzellen aus niedrigdosig immunisierten Mäusen nicht inhibitorisch wirkten.

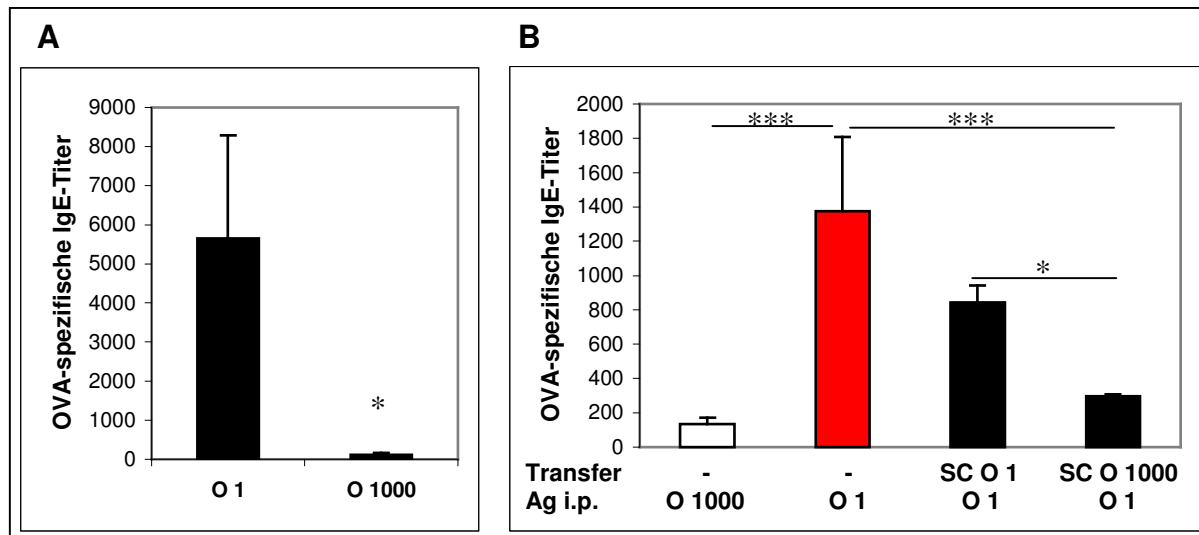


Abb. 3.2.14: IgE-Produktion nach Transfer von O 1- und O 1000-Milzzellen

A) Milzzellen (SC) aus O 1000- und O 1-Donoren wurden in naive Rezipienten (n=4) transferiert. B) Nach Immunisierung der Rezipienten (schwarz) und der Kontrollmäuse (weiß und rot) mit den angegebenen Antigendosen wurde den Mäusen Blut entnommen und die OVA-spezifischen IgE-Mengen in den Seren bestimmt. In der Abbildung sind die Mittelwerte +/- SD der IgE-Titer individueller Seren angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit Sternen gekennzeichnet (* p < 0,05, *** p < 0,001).

Um die Identität von in den Milzzellen enthaltenen Suppressorzellen näher einzugrenzen, wurden in einem weiteren Versuch B-Zellen und T-Zellen aus K100-Mäusen per magnetischer Separation isoliert und i.v. in naive Mäuse transferiert. Alle für den Transfer isolierten Zellpopulationen wurden mittels Durchflusszytometrie-Analyse auf ihre Reinheit hin überprüft (Abb. 3.2.15 B). B-Zellen wurden mit einer Reinheit von ~94% über CD43-MicroBeads negativ aufgereinigt, bei der positiven Separation von T-Zellen mittels CD90-MicroBeads wurde eine Reinheit von ~95% erreicht.

Außerdem wurden parallel dazu Milzzellen in naive Mäuse transferiert, die aus Mäusen stammten, denen bereits zuvor K100-Milzzellen übertragen und die im Anschluss daran mit niedrigen KLH-Dosen aufimmunisiert worden waren. Dieser Test sollte darüber Auskunft geben, wie potent die Suppressorzellen sind und ob die suppressiven Kapazitäten auch noch nach einem „sekundären Transfer“ (K01 (K100 SC)) für eine IgE-Inhibition in den Rezipienten ausreichen. Wie in den vorherigen Versuchen wurden die Rezipienten mit 0,1 µg KLH adsorbiert an Alum immunisiert und Kontrollmäuse, die keinen Zelltransfer bekommen hatten, wurden i.p. mit niedriger und hoher Antigendosis immunisiert.

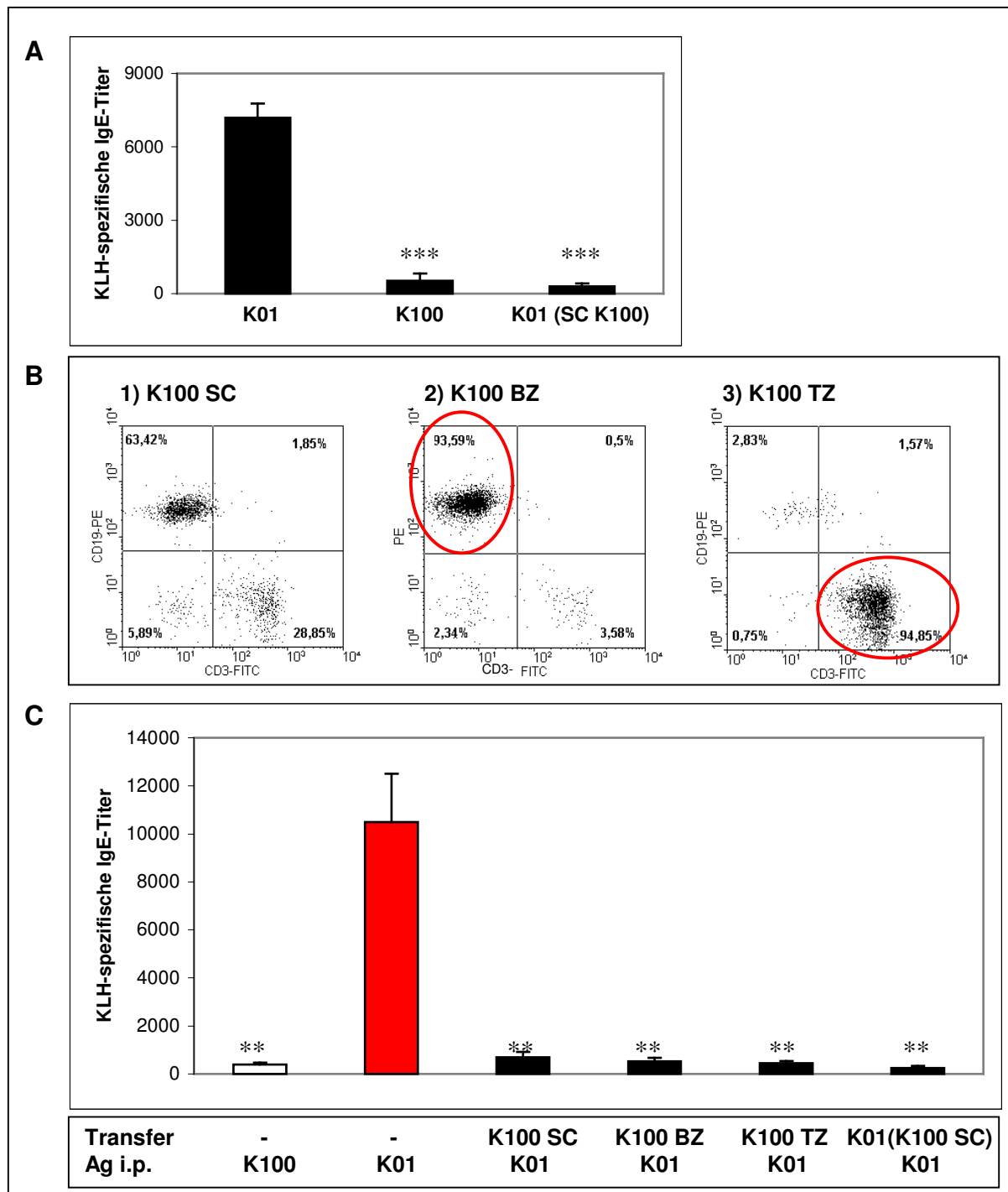


Abb. 3.2.15: IgE-Produktion nach Transfer von Milzzellen, B-Zellen und T-Zellen aus K100-Donoren

A) BALB/c-Donormäuse wurden fünfmal i.p. mit 0,1 µg (K01) bzw. 100 µg KLH (K100) adsorbiert an Alum immunisiert und die IgE-Titer in den Seren wurden bestimmt. Rezipienten von K100-Milzzellen wurden fünfmal mit der niedrigen KLH-Dosis immunisiert, die IgE-Titer in den Seren wurden bestimmt und die Milzzellen aus diesen Mäusen (K01 (K100 SC)) wurden isoliert und in naive Rezipienten (n=4) transferiert. B) Milzzellen (SC) wurden aus K100-Donoren isoliert und B-Zellen (BZ) sowie T-Zellen (TZ) wurden mittels MACS-Separation aufgereinigt. Die Reinheit der separierten B- und T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Anschließend wurden die verschiedenen Zellpopulationen in naive Rezipienten (n=4) transferiert. C) Nach Immunisierung der Rezipienten (schwarz) und der Kontrollmäuse (weiß und rot) mit den angegebenen Antigendosen wurde den Mäusen Blut entnommen und die KLH-spezifischen IgE-Mengen in den Seren bestimmt. In der Abbildung sind die Mittelwerte \pm SD der IgE-Titer individueller Seren angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen und der Positivkontrollgruppe (rot) sind mit Sternen gekennzeichnet (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Wie die K100-Donormäuse, in denen die IgE-Produktion fast vollständig (um 93%) inhibiert war (Abb. 3.2.15 A), produzierten auch die K100-Milzzellrezipienten nach Immunisierung mit niedrigen Antigendosen kaum IgE (Abb. 3.2.15 C). In Abbildung 3.2.15 C ist außerdem zu sehen, dass auch in den Rezipienten, denen Milzzellen übertragen wurden, die aus Mäusen stammten, denen bereits zuvor K100-Milzzellen übertragen und die im Anschluss daran mit niedrigen KLH-Dosen aufimmunisiert worden waren, die IgE-Produktion fast vollständig inhibiert war (um 98% verglichen mit der Positivkontrollgruppe). Die in den Milzzellen von K100-Mäusen enthaltene Suppressorpopulation ist also sehr potent und ist in den Rezipienten entweder wieder in der Milz lokalisiert oder induziert dort neue Suppressorzellen.

Wie K100-Milzzellen supprimierten auch aufgereinigte B- und T-Zellen die IgE-Produktion in den Rezipienten effizient (um 95-97% verglichen mit der Positivkontrollgruppe). Es gibt für den inhibitorischen Effekt der B-Zellen mehrere Erklärungen: er kann dadurch zustande kommen, dass die transferierten antikörperproduzierenden Plasmazellen bei der Immunisierung der Rezipienten das Antigen abfangen und so die Neuaktivierung von B-Zellen verhindert wird. Außerdem können die von den transferierten Plasmazellen sezernierten Antikörper mit dem Antigen Immunkomplexe bilden, die an inhibitorische Rezeptoren binden und somit eine Suppression bewirken. Die Inhibition der IgE-Produktion in Rezipienten von K100-B-Zellen lässt also nicht zwangsläufig auf das Vorhandensein regulatorischer B-Zellen schließen. Deshalb wurden in den folgenden Versuchen zunächst die T-Zellen näher untersucht.

Es gibt zwei Möglichkeiten, T-Zellen mittels magnetischer Separation aufzureinigen. Bei der Positivselektion inkubiert man Milzzellen zunächst mit CD90-MicroBeads. Diese binden an das Oberflächenmolekül CD90, welches den von T-Zellen und NKT-Zellen exprimiert wird. Alle magnetisch markierten Zellen werden beim Separationsvorgang in der Säule zurückgehalten und man erhält nach der Elution ein Zellgemisch aus verschiedenen T-Zellsubpopulationen und NKT-Zellen. NKT-Zellen sind ebenfalls im Zusammenhang mit immunregulatorischen Vorgängen bekannt. Um die Isolierung dieser Zellen zu vermeiden, wählt man eine weitere Möglichkeit, T-Zellen mittels MACS zu isolieren: die Negativseparation von T-Zellen. Bei dieser Methode werden die Milzzellen zunächst mit einem Antikörpercocktail inkubiert, der biotinylierte Antikörper gegen CD45R (B220), CD49b (DX5), CD11b (Mac-1) und Ter-119 enthält, die in einem zweiten Schritt anti-Biotin-MicroBeads binden. Beim

Separationsschritt werden alle Nicht-T-Zellen und auch die DX5-exprimierenden NKT-Zellen depletiert. Man erhält nach der Aufreinigung ein Gemisch aus CD4⁺, CD8⁺ und CD4⁻CD8⁻ T-Zellen. Der direkte Vergleich der IgE-Produktion durch Rezipienten von CD90- bzw. PAN-TZ-angereinigten T-Zellen kann Aufschluss darüber geben, ob NKT-Zellen an den suppressiven Effekten in hochdosig immunisierten Mäusen beteiligt sind. Außerdem hat die Methode der Negativseparation den Vorteil, dass man „untouched“ T-Zellen aufreingt. Bei der Positivselektion kann die Bindung der CD90-MicroBeads unter Umständen zu einer Aktivierung der T-Zellen über CD90 führen und diese Aktivierung könnte die Suppressorkapazität der regulatorischen T-Zellen beeinflussen.

Im nächsten Versuch wurden T-Zellen aus K100-Donoren positiv (TZ_{pos}) bzw. negativ (TZ_{neg}) aufgereinigt und i.v. in naive Mäuse transferiert. Die für den Transfer isolierten Zellpopulationen wurden mittels Durchflusszytometrie-Analyse auf ihre Reinheit hin überprüft (Abb. 3.2.16 B). TZ_{pos} wurden mit einer Reinheit von ~95% aufgereinigt, bei der Separation von TZ_{neg} wurde eine Reinheit von ~98% erreicht.

Die Rezipienten wurden i.p. mit niedrigen KLH-Dosen immunisiert und die IgE-Titer in den Seren bestimmt. Die inhibitorischen Effekte der TZ_{pos} und TZ_{neg} auf die IgE-Produktion in den Rezipienten sind in Abbildung 3.2.16 C im direkten Vergleich dargestellt.

Wie K100-Milzzellen, supprimierten sowohl TZ_{pos} als auch TZ_{neg} die K01-induzierte IgE-Produktion in den Rezipienten sehr effektiv (SC: 86%, TZ_{pos}: 87% und TZ_{neg}: 97%). Mit den negativ separierten T-Zellen wurde die beste Suppression der IgE-Produktion erreicht. Man kann also NKT-Zellen als Hauptregulatoren der IgE-Suppression in hochdosig immunisierten Mäusen ausschließen.

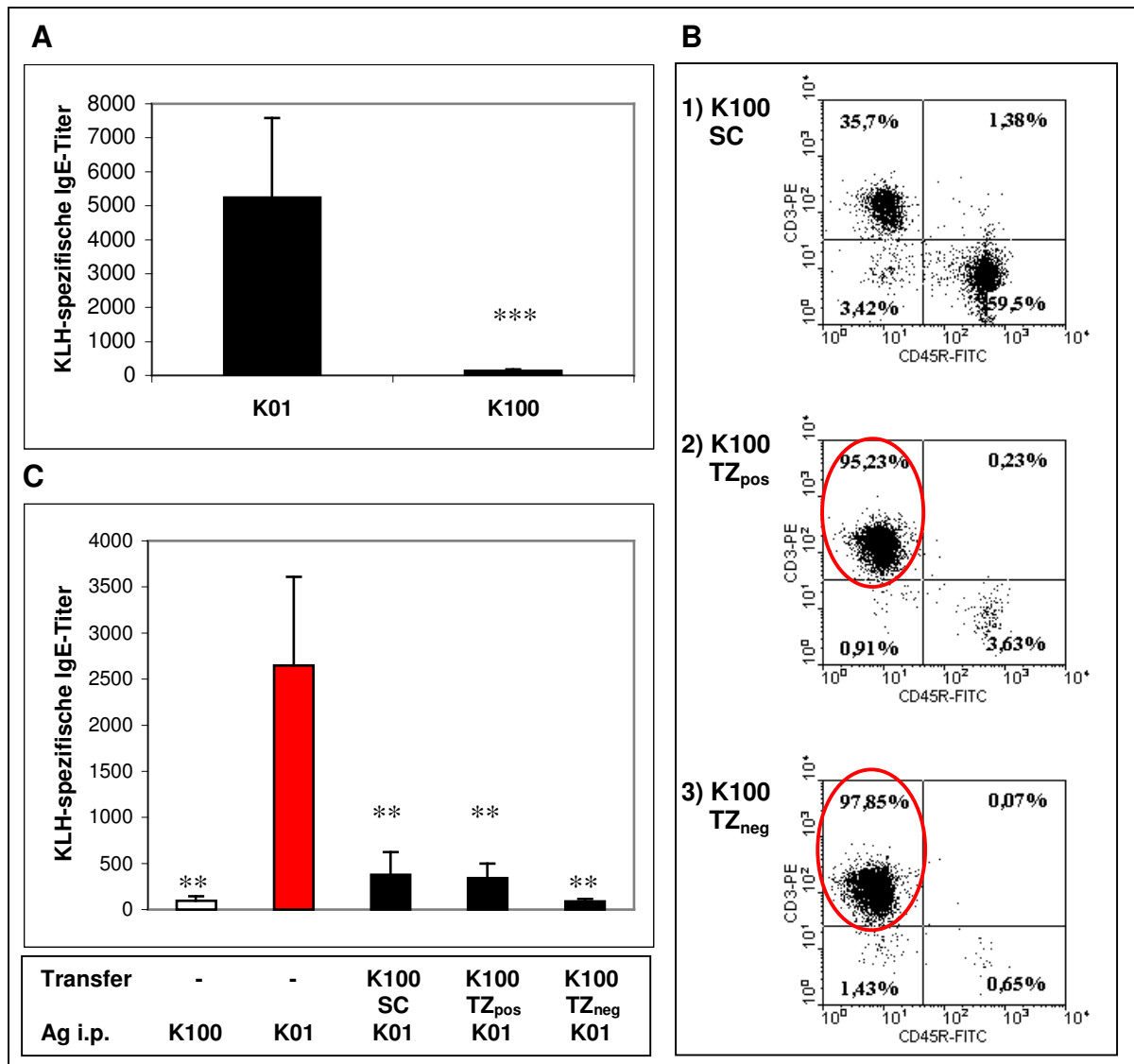


Abb. 3.2.16: IgE-Produktion nach Transfer von Milzzellen, TZ_{pos} und TZ_{neg} aus K100-Donoren

A) BALB/c-Donormäuse wurden repetitiv alle 14 Tage i.p. mit 0,1 µg (K01) bzw. 100 µg KLH (K100) adsorbiert an Alum immunisiert und die IgE-Titer in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt. B) Aus K100 Milzzellen (SC) wurden T-Zellen mittels positiver (TZ_{pos}) und negativer (TZ_{neg}) MACS-Separation aufgereinigt und die Reinheit der isolierten Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. C) Milzzellen, TZ_{pos} oder TZ_{neg} aus K100-Donoren wurden in naive Rezipienten (n=4) transferiert. Nach Immunisierung der Rezipienten (schwarz) und der Kontrollmäuse (weiß und rot) mit den angegebenen Antigendosen wurde den Mäusen Blut entnommen und die KLH-spezifischen IgE-Mengen in den Seren bestimmt. In der Abbildung sind die Mittelwerte +/- SD der IgE-Titer individueller Seren angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen und der Positivkontrollgruppe (rot) sind mit Sternen gekennzeichnet (** p < 0,01, *** p < 0,001).

Die bisherigen Ergebnisse implizieren, dass die Suppression der IgE-Produktion in hochdosig immunisierten Mäusen durch regulatorische T-Zellen vermittelt wird. Deshalb wurden nun positiv aufgereinigte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus K100-Mäusen einzeln oder in Kombination in naive Rezipienten transferiert. Wie bereits beschrieben wurden die Rezipienten danach i.p. mit 0,1 µg KLH adsorbiert an Alum immunisiert. Kontrolltiere wurden mit 0,1 bzw. 100 µg KLH adsorbiert an Alum immunisiert.

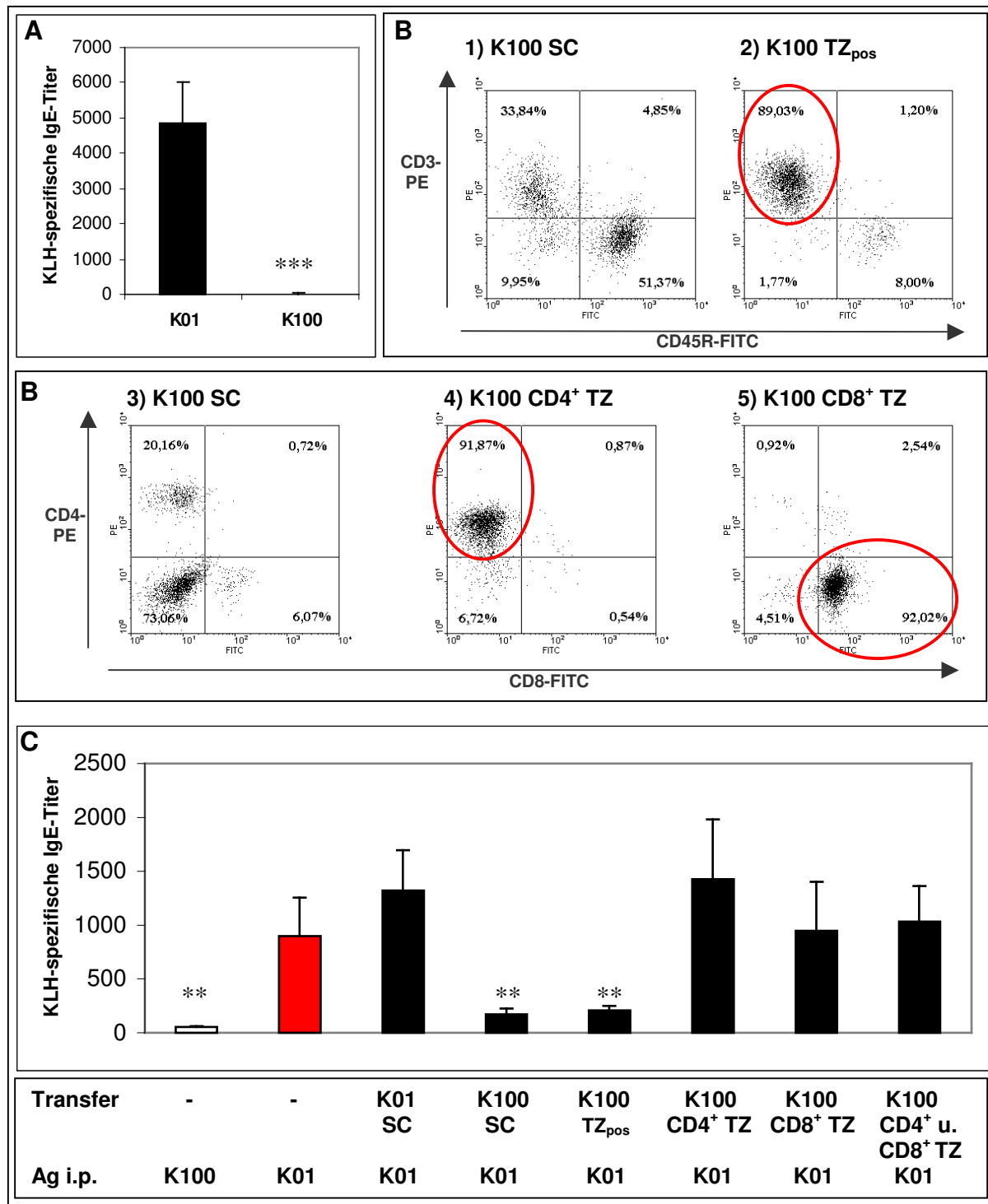


Abb. 3.2.17: IgE-Produktion nach Transfer von Milzzellen, T-Zellen bzw. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellsubpopulationen aus K100-Donoren

A) BALB/c-Donormäuse wurden repetitiv alle 14 Tage i.p. mit 0,1 µg (K01) bzw. 100 µg KLH (K100) adsorbiert an Alum immunisiert und die IgE-Titer in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt. B) Aus K100-Milzzellen wurden TZ_{pos} bzw. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellsubpopulationen magnetisch separiert und die Reinheit der Zellpopulationen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. C) Milzzellen aus K01-Donoren und Milzzellen bzw. aufgereinigte T-Zellpopulationen aus K100-Donoren wurden in naive Rezipienten (n=4) transferiert. Nach Immunisierung der Rezipienten (schwarz) und der Kontrollmäuse (weiß und rot) mit den angegebenen Antigendosen wurde den Mäusen Blut entnommen und die KLH-spezifischen IgE-Mengen in den Seren bestimmt. In der Abbildung sind die Mittelwerte +/- SD der IgE-Titer individueller Seren angegeben. Die Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit Sternen gekennzeichnet (** p < 0,01, *** p < 0,001).

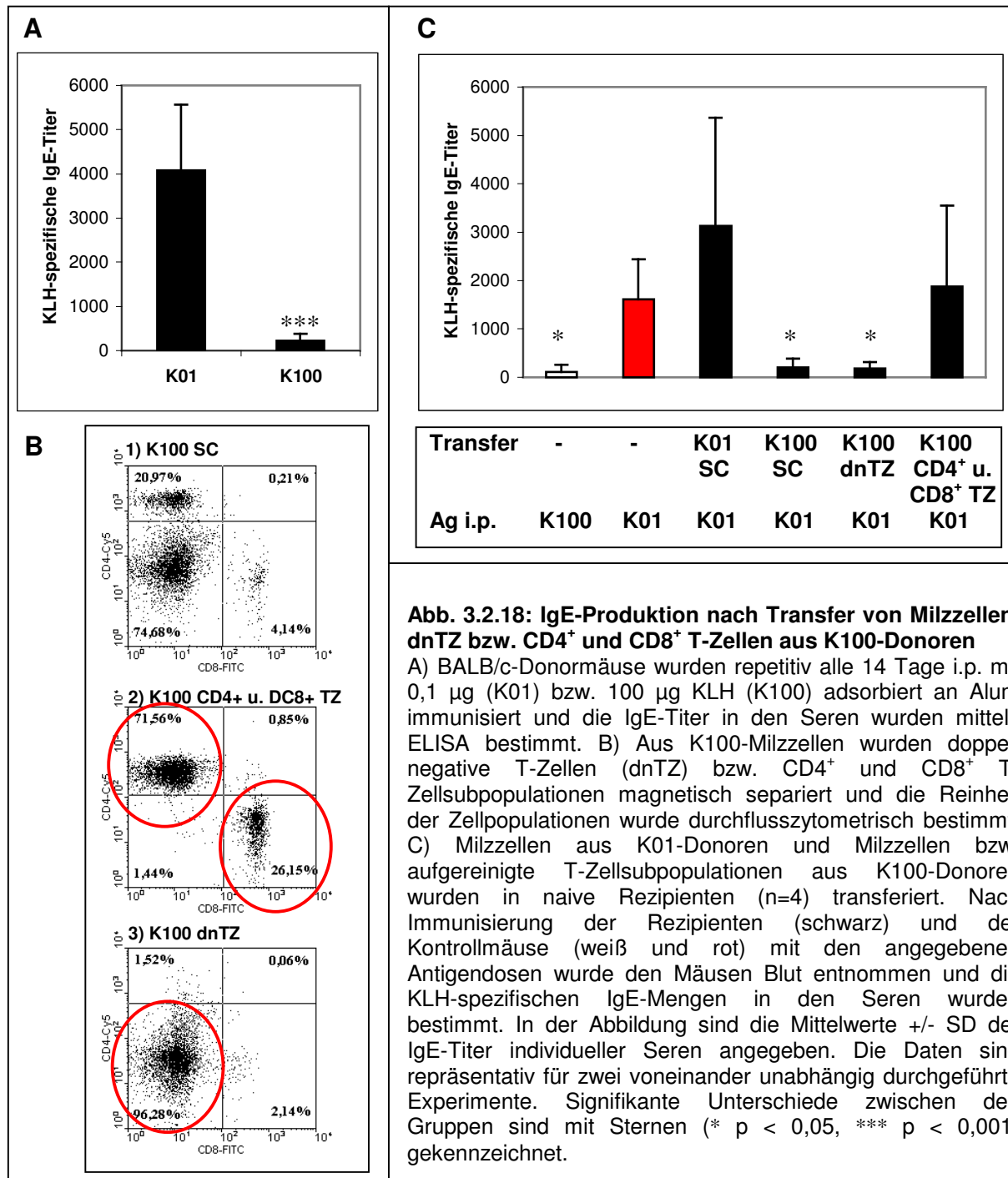
Die für den Transfer isolierten Zellpopulationen wurden mittels Durchflusszytometrie-Analyse auf ihre Reinheit hin überprüft (Abb. 3.2.17 B). TZ_{pos} wurden mit einer Reinheit von ~90% aufgereinigt, bei der Separation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurde eine Reinheit von ~92% erreicht.

Abbildung 3.2.17 C zeigt die KLH-spezifischen IgE-Titer in den Seren der Rezipienten und der Kontrolltiere nach fünf Immunisierungen.

Während K100-Milzzellen und CD90-aufgereinigte K100-T-Zellen die IgE-Produktion in den Rezipienten sehr gut supprimierten (81% und 77%), konnte der suppressive Effekt weder durch CD4⁺ noch durch CD8⁺ T-Zellen übertragen werden. Auch der Transfer einer Kombination der beiden T-Zellpopulationen war wirkungslos. In den Rezipienten von K01-Milzzellen sowie von K100-CD4⁺ T-Zellen kam es sogar verglichen mit der Positivkontrollgruppe zu einem leichten Anstieg der IgE-Produktion. Dieser Unterschied in der IgE-Produktion war jedoch nicht signifikant.

Wie sich bereits in den Analysen der Expression von Oberflächenmolekülen, Zytokinen und Transkriptionsfaktoren, die mit einem regulatorischen Phänotyp assoziiert sind, andeutete, scheinen konventionelle regulatorische CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen an der IgE-Suppression in hochdosig immunisierten Mäusen nicht beteiligt zu sein.

Neben den bisher untersuchten Zellpopulationen existiert unter den T-Zellen noch ein weiterer Zelltyp mit immunregulatorischen Eigenschaften, der erstmals von Londei et al. [1989] beschrieben wurde: die CD4⁻CD8⁻ doppelt negativen T-Zellen (dnTZ). Diese sind z.B. an der Induktion von Transplantattoleranz beteiligt [Zhang et al. 2000, Zhang et al. 2006]. In den nächsten Transferversuchen wurde daher das suppressive Potential dieser doppelt-negativen T-Zellen im Zusammenhang mit der antigendosisabhängigen IgE-Suppression näher untersucht. Um diese Zellpopulation, die nur mit niedriger Frequenz in den Milzzellen enthalten ist, aufzureinigen, wurde zunächst eine Negativseparation von T-Zellen aus K100-Milzzellen durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurden aus den T-Zellen die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch Markierung mit anti-CD4- bzw. anti-CD8-MicroBeads depletiert. Die so isolierten dnTZ besaßen eine Reinheit von ~96% und wurden in naive Rezipienten transferiert (siehe Abb. 3.2.18 B). Zur Kontrolle wurden auch die von der Depletionssäule eluierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in eine Rezipientengruppe transferiert.



Bei der Reinheitsanalyse (siehe Abb. 3.2.18 B) der isolierten Zellen ist zu beachten, dass die anti-CD4- und anti-CD8-MicroBeads an die gleichen Bindungsstellen binden, die auch von den anti-CD4- und anti-CD8-FACS-Antikörper erkannt werden. Somit ist bei Zellen, die über anti-CD4- und anti-CD8-MicroBeads aufgereinigt werden bereits ein Teil der Bindungsstellen belegt, was bei der durchflusszytometrischen Analyse der aufgereinigten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu einer verminderten Fluoreszenzintensität führt. Dem wurde Rechnung getragen,

indem unterschiedliche „Gates“ für „untouched“ Zellen (Milzzellen und dnTZ) und für mit Beads markierte Zellen (CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen) gesetzt wurden.

In den vorherigen Versuchen konnte der Transfer von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus K100-Milzzellen einzeln oder kombiniert die IgE-Produktion in den Rezipienten nicht supprimieren (siehe Abb. 3.2.17 C). In Abbildung 3.2.18 C ist dargestellt, dass auch die von der Depletionssäule eluierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen keinen Effekt auf die IgE-Produktion in den Rezipienten hatten. Dagegen war die antigenspezifische IgE-Produktion in Rezipienten von dnTZ aus K100-Donoren um 94% vermindert. Da der suppressive Effekt mit dnTZ aus K100-Donoren übertragen werden konnte, kann man also davon ausgehen, dass antigendosisabhängige IgE-Suppression *in vivo* von CD4⁻CD8⁻ doppelt negativen regulatorischen T-Zellen vermittelt wird.

3.3 Herstellung und Funktionsanalysen von IL-10 und TGFβ kodierenden Expressionsplasmiden zur Induktion von regulatorischen T-Zellen

Im letzten Teil der Arbeit wurde die DNA-Vakzinierung im Mausmodell der IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion evaluiert und die Auswirkungen auf eine allergieinduzierende Proteinsensibilisierung untersucht. Zum Zwecke der DNA-Vakzinierung mit dem Ziel der Modulierung von allergenspezifischen Immunantworten wurden zunächst verschiedene Expressionsplasmide, die IL-10 und TGFβ kodieren, kloniert. Anschließend wurden Analysen zu deren Funktionalität *in vitro* und *in vivo* durchgeführt.

3.3.1 Herstellung von IL-10 und TGFβ kodierenden Expressionsplasmiden

Zum Zwecke der DNA-Vakzinierung wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene DNA-Konstrukte hergestellt. Ein Teil der in den Experimenten verwendeten Expressionsplasmide lag schon aus vorhergehenden Arbeiten in der Arbeitsgruppe vor (pFascin-βGal, pCMV-EGFP, pFascin-EGFP, pCMV-IL10).

3.3.1.1 Klonierung von pCMV-TGFβ1-IRES-cOVA

Aus dem vorliegenden Vektor pZero-TGFβ1 (Mus musculus TGFβ1 NM_011577.1) (Abb. 3.3.1 A) wurde TGFβ1 (1.2 kb) ausgeschnitten. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Hind III-Schnittstelle in eine Nhe I-Schnittstelle umgewandelt. pZero-TGFβ1 wurde mit Hind III verdaut und die überhängenden Enden wurden mit Hilfe von Klenow-Fragment aufgefüllt. Anschließend wurden die glatten Enden religiert. Dadurch entstand eine Nhe I-Schnittstelle (siehe Abb. 3.3.1 B).

Als nächstes wurde die Not I-Schnittstelle inaktiviert, da diese bei späteren Klonierungsschritten stören würde. Dazu wurde pZero-TGFβ1 mit Not I verdaut und die überhängenden Enden mit Hilfe von Klenow-Fragment aufgefüllt. Anschließend wurden die glatten Enden religiert.

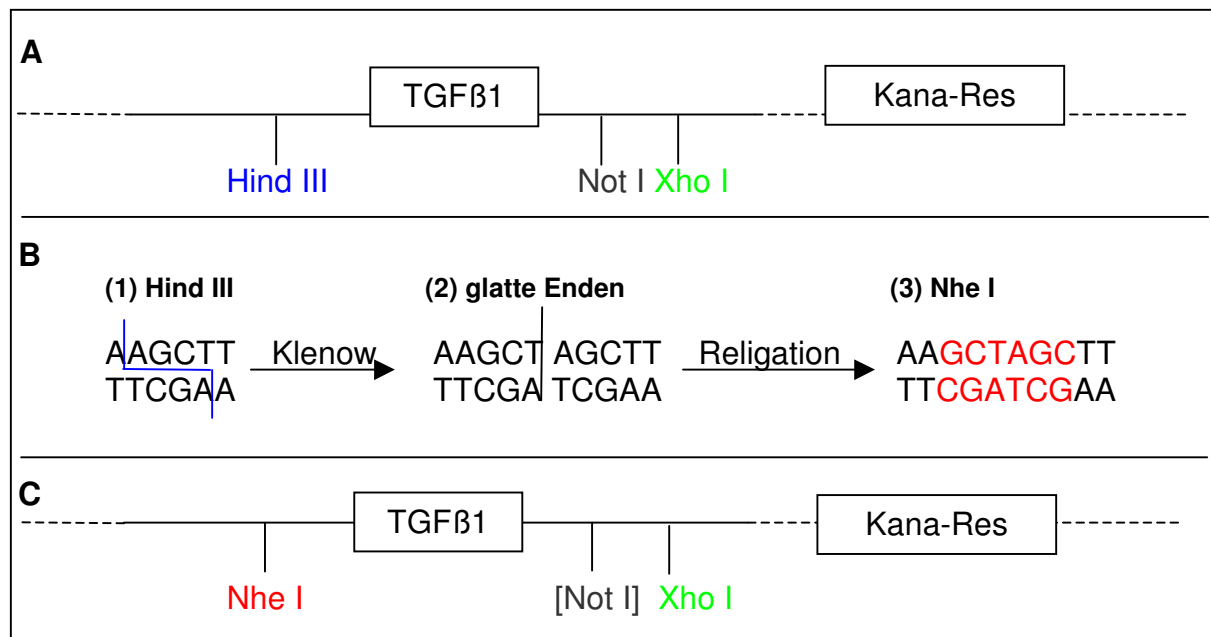


Abb. 3.3.1: pZero-TGFβ1: Schnittstellenumwandlung von Hind III zu Nhe I und Inaktivierung von Not I

A) zeigt das Ausgangskonstrukt pZero-TGFβ1 mit den Restriktionsschnittstellen Hind III (blau), Not I (grau) und Xho I (grün).

B) zeigt die Schnittstellensequenz von Hind III (1). Nach der Klenow-Reaktion sind glatte Enden entstanden (2). Diese konnten problemlos religiert werden, wobei eine Nhe-Schnittstelle entstand (3).

C) Die Abbildung zeigt das Konstrukt pZero-TGFβ1 nach Umwandlung von Hind III in Nhe I (rot) und der Inaktivierung der Schnittstelle Not I (grau). Die Inaktivität der Not I-Schnittstelle ist durch eckige Klammern gekennzeichnet. Weiterhin ist Xho I (grün) eingezeichnet. Über Nhe I und Xho I wurde der TGFβ1-ORF im Folgenden exzisiert.

Aus dem so veränderten Konstrukt pZero-TGFβ1 (Abb. 3.3.1 C) wurde der TGFβ1-ORF durch Verdau mit Nhe I und Xho I exzisiert.

Zielvektor für das TGF β 1-Mini-Gen war das vorliegende Expressionsplasmid pCMV-cOVA (Abb. 3.3.2). Dieses wurde mit Nhe I und Xho I doppelverdaut. Das TGF β 1-ORF-Fragment wurde nun über die Nhe I- und Xho I-Restriktionsenden in das linearisierte pCMV-cOVA-Konstrukt ligiert, was das Zwischenkonstrukt pCMV-TGF β 1-cOVA ergab (Abb. 3.3.3).

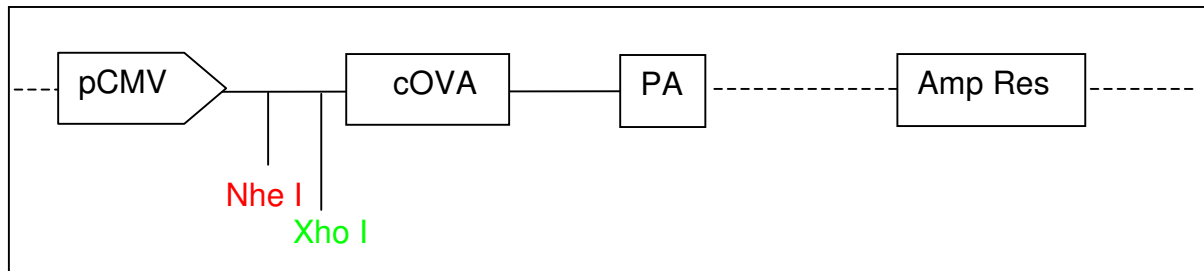


Abb. 3.3.2: Konstruktskizze von pCMV-cOVA

Die Abbildung zeigt das Zielkonstrukt pCMV-cOVA mit den Restriktionsschnittstellen Nhe I (rot) und Xho I (grün). Der Zielvektor wurde mit Nhe I und Xho I doppelverdaut.

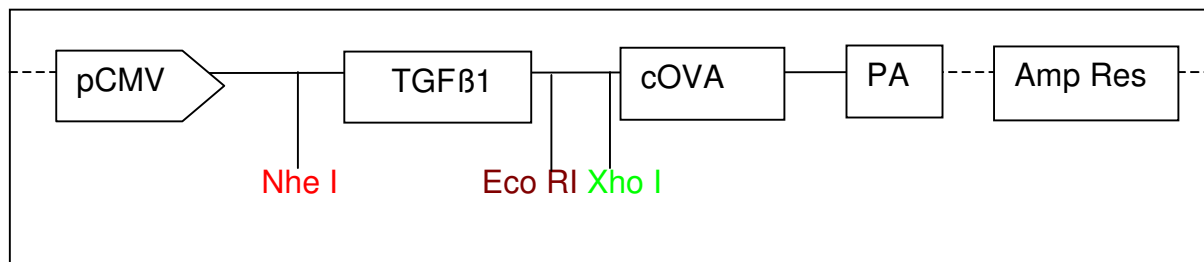


Abb. 3.3.3: Zwischenkonstrukt pCMV-TGF β 1-cOVA

Nach der Ligation von TGF β 1 in das linearisierte pCMV-cOVA-Konstrukt über die passenden Restriktionssenden von Nhe I (rot) und Xho I (grün) entstand das Zwischenkonstrukt pCMV-TGF β 1-cOVA. Eingezeichnet ist auch die Schnittstelle für Eco RI (braun), die für spätere Klonierungen benötigt wurde.

Um eine Doppelexpression von TGF β 1 und cOVA zu gewährleisten, musste eine IRES (internal ribosome entry site) zwischen TGF β 1 und cOVA eingefügt werden. Diese wurde aus dem vorliegenden Vektor pZero-IRES (Abb. 3.3.4 A) ausgeschnitten. Zuerst musste die Not I-Schnittstelle in pZero-IRES inaktiviert werden, da diese bei späteren Klonierungen stören würde. Dazu wurde der Vektor mit Not I verdaut, und die überhängenden Enden mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Anschließend wurden die glatten Enden religiert (Abb. 3.3.4 B). Das IRES-Fragment (700 bp) wurde nun durch Doppelverdau mit Eco RI und Xho I exzisiert. Das Zwischenkonstrukt pCMV-TGF β 1-cOVA (Abb. 3.3.3) wurde ebenfalls mit Eco RI und Xho I doppelverdaut und anschließend mit dem IRES-Fragment ligiert. So entstand das Konstrukt pCMV_(ohne Intron)-TGF β 1-IRES-cOVA, bei dem jedoch noch das Intron hinter dem CMV-Promoter fehlte (Abb. 3.3.5).

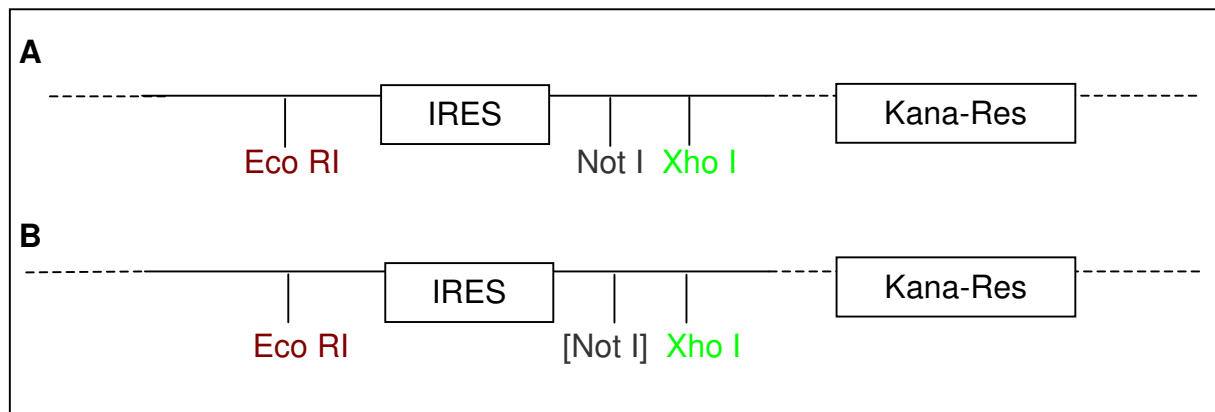


Abb. 3.3.4: pZero-IRES: Inaktivierung von Not 1

A) zeigt das Ausgangskonstrukt pZero-IRES mit den Restriktionsschnittstellen Eco RI (braun), Not I (grau) und Xho I (grün).

B) zeigt das Konstrukt pZero-IRES nach der Inaktivierung der Schnittstelle Not I (grau). Die Inaktivität der Not I-Schnittstelle ist durch eckige Klammern gekennzeichnet. Weiterhin sind Eco RI (braun) und Xho I (grün) eingezeichnet. Über Eco RI und Xho I wurde die IRES im Folgenden exiziert.

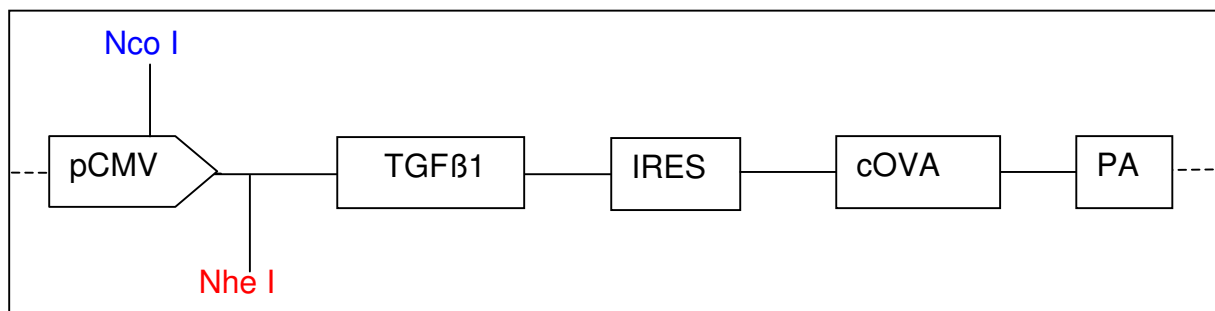


Abb. 3.3.5: Konstruktsskizze von pCMV_(ohne Intron)-TGFβ1-IRES-cOVA

Die Abbildung zeigt das vorläufige Expressionsplasmid pCMV_(ohne Intron)-TGFβ1-IRES-cOVA, bei dem das vollständige Intron nach dem CMV-Promoter fehlt. Dieses wurde aus dem pCI-Leervektor über die Schnittstellen Nco I und Nhe I ausgeschnitten. Auch das vorläufige Expressionsplasmid pCMV_(ohne Intron)-TGFβ1-IRES-cOVA wurde mit Nco I (blau) und Nhe I (rot) doppelverdaut. Über die passenden Restriktionssenden wurde im Folgenden das intron-enthaltende Fragment in das linearisierte vorläufige Expressionsplasmid pCMV_(ohne Intron)-TGFβ1-IRES-cOVA ligiert, so dass das Endkonstrukt pCMV-TGFβ1-IRES-cOVA entstand.

Da das Intron expressionssteigernd wirkt und somit für die Funktionalität des Expressionsplasmids von Bedeutung ist, wurde es aus dem pCI-Leervektor (Abb. 3.3.6) über die Schnittstellen Nco I und Nhe I ausgeschnitten. Auch das Expressionsplasmid pCMV_(ohne Intron)-TGFβ1-IRES-cOVA wurde mit Nco I und Nhe I doppelverdaut. Das linearisierte Konstrukt pCMV_(ohne Intron)-TGFβ1-IRES-cOVA und das intron-enthaltende Fragment wurden isoliert und über die passenden Restriktionssenden ligiert, so dass das Endkonstrukt pCMV-TGFβ1-IRES-cOVA entstand (Abb. 3.3.7).

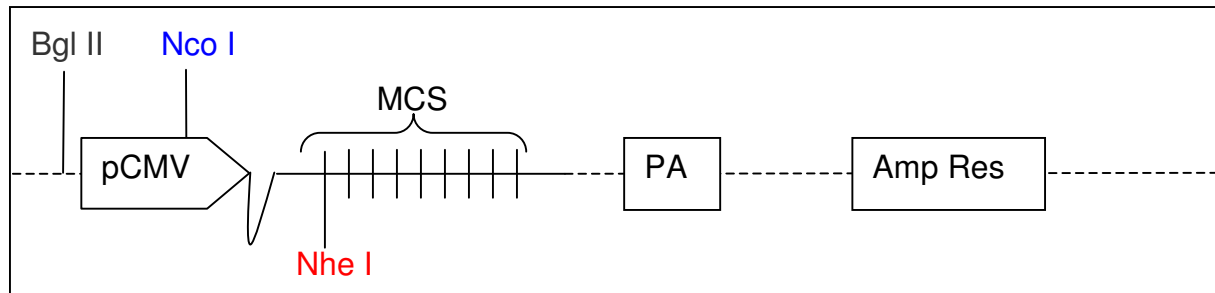


Abb. 3.3.6: Skizze des pCI-Leervektor

Das Intron (✓) wurde aus dem pCI-Leervektor über die Schnittstellen Nco I (blau) und Nhe I (rot) ausgeschnitten. Dargestellt ist außerdem die multiple Klonierungsstelle (MCS), deren erste Schnittstelle Nhe I (rot) ist. Die Schnittstelle Bgl II (grau) wurde zur Klonierung von pFascin benötigt.

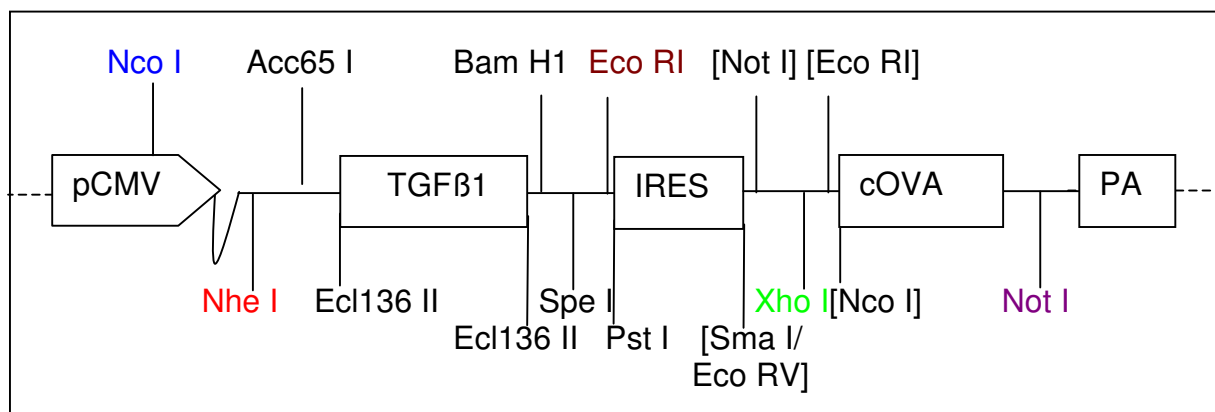


Abb. 3.3.7: Konstruktskizze von pCMV-TGFβ1-IRES-cOVA

Die Abbildung zeigt das Konstrukt pCMV-TGFβ1-IRES-cOVA auf dem Vektorhintergrund von pCI. Das Expressionskonstrukt beinhaltet das Ampicillinresistenzgen. Eingezeichnet sind die Restriktionsschnittstellen EcoRI (braun) und Xho I (grün), über welche das IRES-Fragment in das Vorläuferkonstrukt pCMV-TGFβ1-cOVA ligiert worden war, sowie die Schnittstellen für Nco I (blau) und Nhe I (rot), über die das fehlende Intron eingefügt worden war. Außerdem sind alle weiteren Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die für eventuelle Klonierungsmaßnahmen auf Basis dieses Konstrukts relevant sind. Inaktivierte Schnittstellen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet.

3.3.1.2 Klonierung von pCMV-TGFβ1

Aus dem unter 3.3.1.1 beschriebenen und in Abb. 3.3.7 dargestellten Expressionsplasmid pCMV-TGFβ1-IRES-cOVA wurde ein Fragment, das IRES und cOVA enthielt, über Eco RI und Not I ausgeschnitten. Der Restriktionsansatz wurde komplett auf ein Agarosegel aufgetragen (2.3.8) und das Zielfragment mit einer Größe von ca. 5 kb aus dem Gel eluiert (2.3.9). Da die Restriktionsschnittstellen nicht kompatibel waren, wurden die überhängenden Enden mit Hilfe von Klenow-Fragment

aufgefüllt (siehe 2.3.11). Über die entstandenen glatten Enden konnte das Fragment nun religiert werden, wobei das Konstrukt pCMV-TGFβ1 entstand (Abb. 3.3.8).

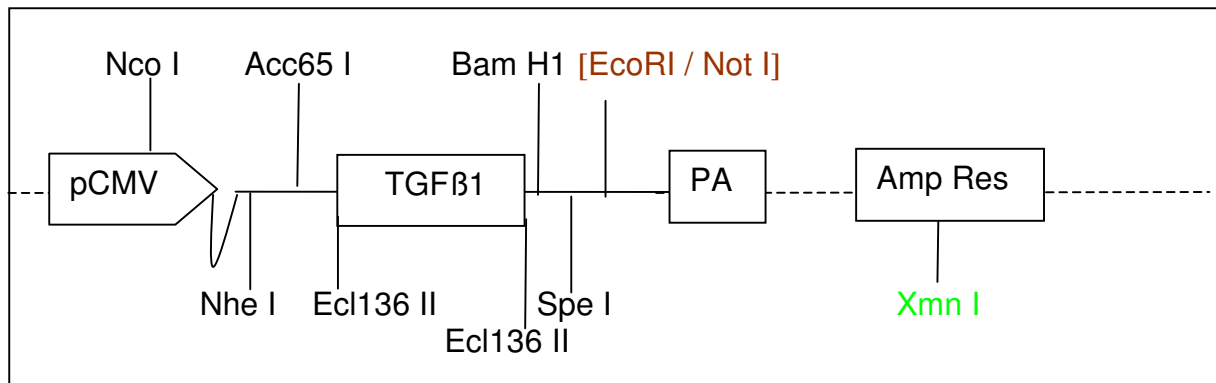


Abb. 3.3.8 Konstruktskizze von pCMV-TGFβ1

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pCMV-TGFβ1 auf dem Vektorhintergrund von pCI. Eingezeichnet sind die Schnittstellen Eco RI und Not I (braun), über welche IRES und cOVA ausgeschnitten worden waren. Die Schnittstellen wurden durch die Klenow-Reaktion inaktiviert und sind daher durch eckige Klammern gekennzeichnet. Außerdem sind alle weiteren Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die für eventuelle Klonierungen auf Basis dieses Konstrukts relevant sind.

3.3.1.3 Klonierung von pFascin

Der murine Fascin-Promoter lag in dem Vektor pZero-Fascin (Abb. 3.3.9) vor. Der Fascin-Promoter wurde zunächst in den pCI-Vektor umkloniert. Dazu wurde der pCI-Vektor (Abb. 3.3.6) mit Bgl II und Nhe I doppelverdaut, wodurch der CMV-Promoter exzidiert wurde. Gleichzeitig wurde pZero-Fascin mit Bam HI und Nhe I doppelverdaut und so der Fascin-Promoter exzidiert. Der pCI-Vektorhintergrund wurde anschließend über eine Gelelektrophorese und eine Gelelution aufgereinigt, der Verdau von pZero-Fascin wurde über Minispin-Säulen (Qiagen) aufgereinigt. Der Fascin-Promoter wurde über die kompatiblen Enden von Bgl II und Bam HI sowie Nhe I in den pCI-Vektor ligiert (Abb. 3.3.10).

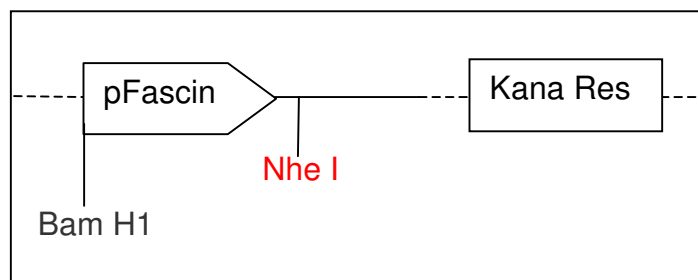


Abb. 3.3.9: Konstruktskizze von pZero-Fascin

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung von pZero-Fascin. Das Expressionskonstrukt beinhaltet das Kanamycinresistenzgen. Der Fascin-Promoter wurde über die Schnittstellen für Bam H1 (grau) und Nhe I (rot) exzidiert.

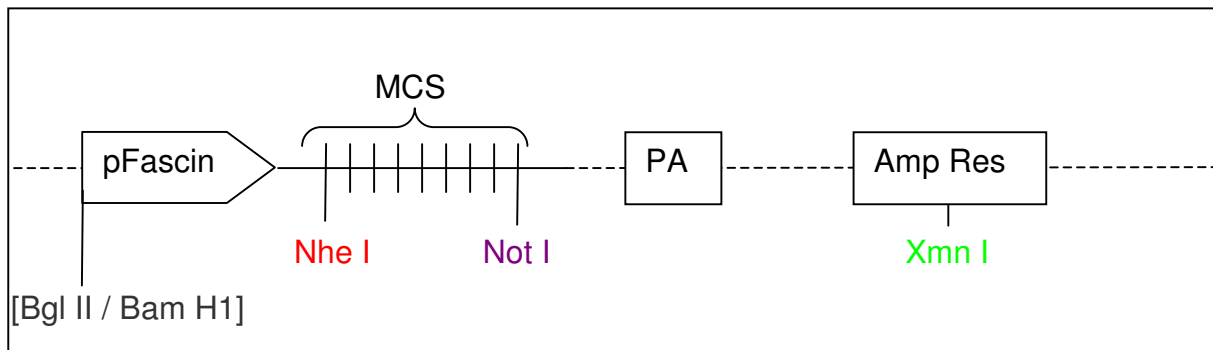


Abb. 3.3.10: Konstruktskizze von pFascin

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pFascin auf dem Vektorhintergrund von pCI. Das Expressionskonstrukt beinhaltet das Ampicillinresistenzgen. Der Fascin-Promoter wurde über die kompatiblen Enden Bgl II und Bam HI (grau) sowie Nhe I (rot) in den pCI-Vektor ligiert. Die eingezeichneten Restriktionsschnittstellen für Nhe I (rot) und Not I (violett) wurden für spätere Klonierungen verwendet.

3.3.1.4 Klonierung von pFascin-TGFβ1-IRES-cOVA

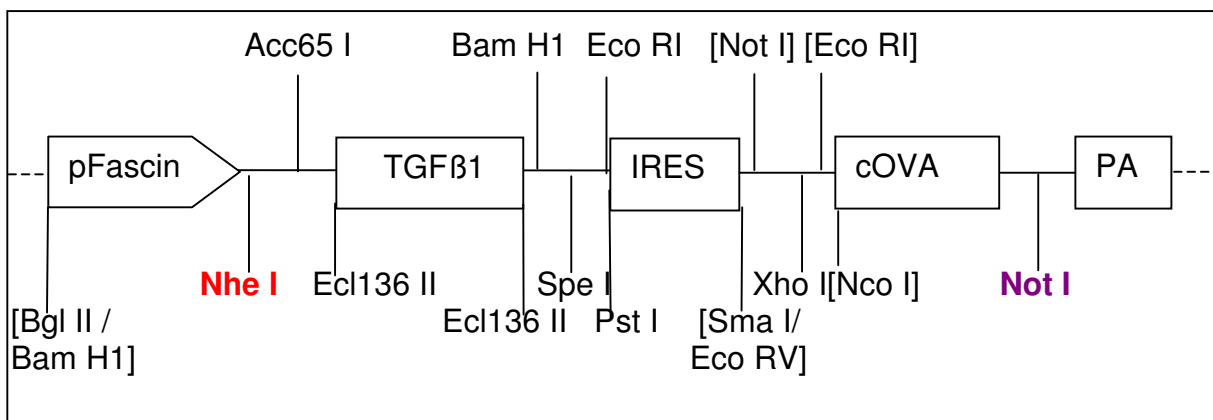


Abb. 3.3.11: Konstruktskizze von pFascin-TGFβ1-IRES-cOVA

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pFascin-TGFβ1-IRES-cOVA auf dem Vektorhintergrund von pCI. Das Expressionskonstrukt beinhaltet das Ampicillinresistenzgen. Eingezeichnet sind die Restriktionsschnittstellen Nhe I (rot) und Not I (violett), über welche die Expressionskassette TGFβ1-IRES-cOVA in den linearisierten pFascin-Vektor ligiert worden war. Außerdem sind alle weiteren Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die für eventuelle Klonierungsmaßnahmen auf Basis dieses Konstrukts relevant sind. Inaktivierte Schnittstellen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet.

Aus dem unter 3.3.1.1 beschriebenen Konstrukt wurde die Expressionskassette TGFβ1-IRES-cOVA über die Restriktionsschnittstellen Nhe I und Not I exzisiert (siehe Abb. 3.3.7). Die Expressionskassette wurde über ein präparatives Agarosegel (2.3.8) vom Vektorhintergrund getrennt und aufgereinigt (2.3.9). Das unter 3.3.1.3 beschriebene Plasmid pFascin wurde über Nhe I und Not I linearisiert. Die Expressionskassette konnte nun über die passenden Restriktionseenden in den

pFascin-Vektor ligiert werden, so dass das Konstrukt pFascin-TGF β 1-IRES-cOVA (Abb. 3.3.11) entstand.

3.3.1.5 Klonierung von pFascin-TGF β 1

Aus dem unter 3.3.1.2 beschriebenen Konstrukt pCMV-TGF β 1 (Abb. 3.3.8) wurde TGF β 1 über die Restriktionsschnittstellen *Nhe* I und *Xmn* I exzisiert. Die Restriktionsschnittstelle *Xmn* I ist im Ampicillin-Resistenzgen lokalisiert. Der unter 3.3.1.3 beschriebene Vektor pFascin (Abb. 3.3.10) auf pCI-Hintergrund wurde ebenfalls mit *Nhe* I und *Xmn* I restringiert. Die Restriktionsansätze wurden komplett auf ein Agarosegel aufgetragen (2.3.8) und die Fragmente mit den Größen 2,7 kb (aus pCMV-TGF β) und 4,1 kb (aus pFascin) wurden aus dem Gel eluiert (2.3.9). Die beiden Fragmente konnten nun direkt über ihre passenden Restriktionsenden ligiert werden, so dass das Endkonstrukt pFascin-TGF β 1 entstand (Abb. 3.3.12).

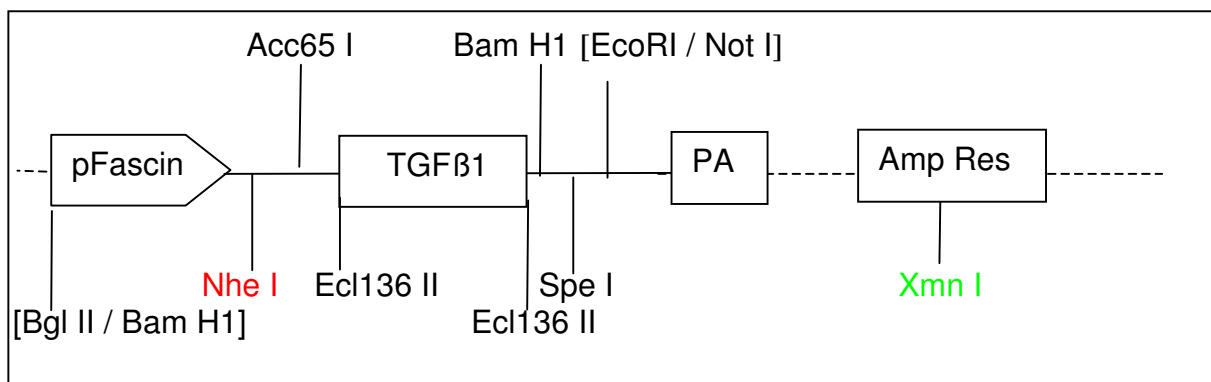


Abb. 3.3.12: Konstruktskizze von pFascin-TGF β 1

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pFascin-TGF β 1 auf dem Vektorhintergrund von pCI mit den eingezeichneten Restriktionsschnittstellen *Nhe* I (rot) und *Xmn* I (grün), über die die Fragmente, die den Fascinpromoter und das TGF β 1-Gen enthielten, ligiert wurden. Außerdem sind alle weiteren Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die für eventuelle Klonierungsmaßnahmen auf Basis dieses Konstrukts relevant sind. Inaktivierte Schnittstellen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet.

3.3.1.6 Klonierung von pCMV-IL-10-IRES-cOVA

Das bereits vorliegende Expressionsplasmid pCMV-IL-10 (Mus musculus IL-10 NM_010548.1) (Abb. 3.3.13) wurde mit *Eco* RV und *Not* I linearisiert. Das unter 3.3.1.1 beschriebene Konstrukt pCMV-TGF β 1-IRES-cOVA (Abb. 3.3.7) wurde zunächst mit *Eco* RI restringiert und die Enden mit der Klenow-Reaktion aufgefüllt.

Dann wurde das linearisierte Plasmid mit Not I geschnitten. Dabei wurde ein Fragment, das IRES-cOVA enthielt (~1,7 kb) aus pCMV-TGFβ1-IRES-cOVA exzisiert. Dieses IRES-cOVA-enhaltende Fragment wurde über das glatte Ende von Eco RV und das aufgefüllte und geglättete Eco RI-5'-Ende und über die passenden Not I-Restriktionsenden in pCMV-IL-10 ligiert, so dass das Konstrukt pCMV-IL-10-IRES-cOVA entstand (Abb. 3.3.14).

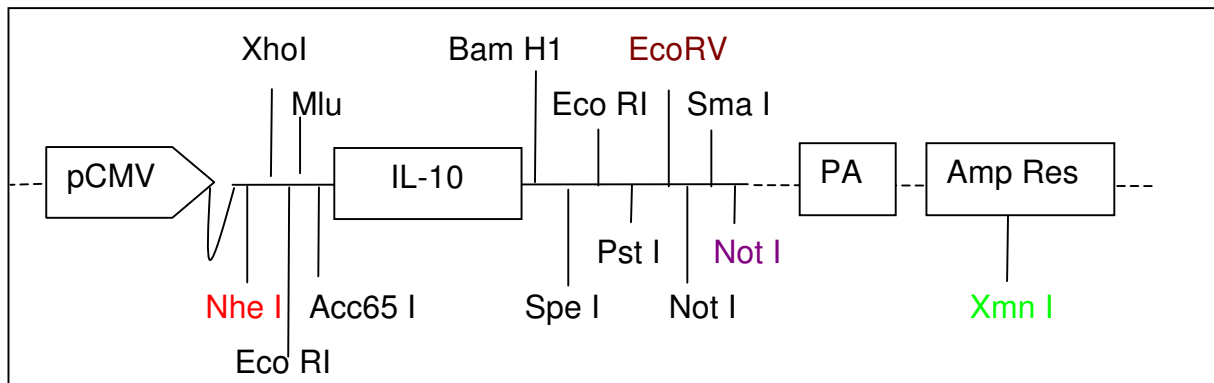


Abb. 3.3.13: Konstruktskizze von pCMV-IL-10

Die Abbildung zeigt das Expressionsplasmid pCMV-IL-10 auf pCI-Vektorhintergrund. Eingezeichnet sind die für Klonierungszwecke relevanten Schnittstellen. Zur Klonierung von pCMV-IL-10-IRES-cOVA wurde pCMV-IL-10 zunächst mit Eco RV (braun) und Not I (violett) linearisiert.

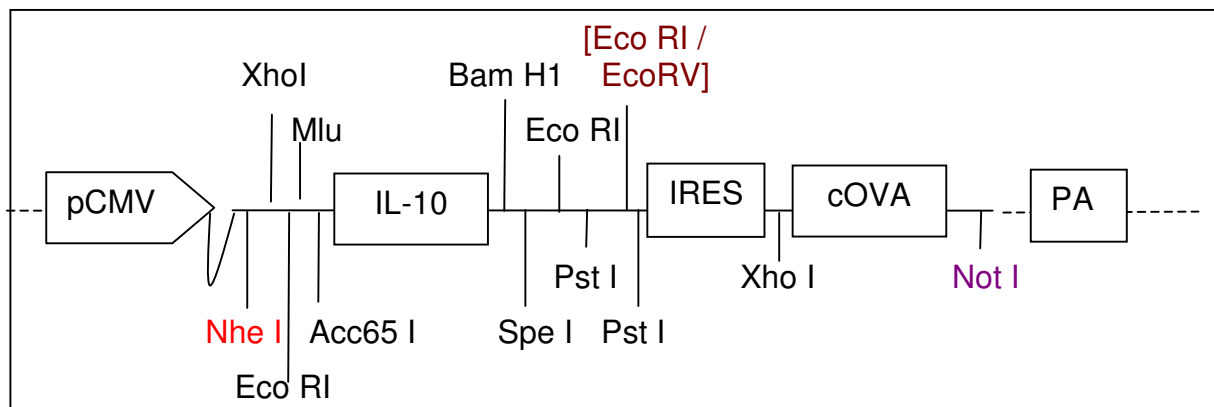


Abb. 3.3.14: Konstruktskizze von pCMV-IL-10-IRES-cOVA

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pCMV-IL-10-IRES-cOVA auf dem Vektorhintergrund von pCI. Das Expressionskonstrukt beinhaltet das Ampicillinresistenzgen. Eingezeichnet sind die inaktivierten Restriktionsschnittstellen Eco RV und Eco RI (braun), durch eckige Klammern gekennzeichnet, sowie Not I (violett), über welche die Expressionskassette IRES-cOVA in den linearisierten pCMV-IL-10-Vektor ligiert worden war. Außerdem sind alle weiteren Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die für eventuelle Klonierungen auf Basis dieses Konstrukts relevant sind.

3.3.1.7 Klonierung von pFascin-IL-10-IRES-cOVA

Aus dem unter 3.3.1.6 beschriebenen Konstrukt wurde die Expressionskassette IL-10-IRES-cOVA über die Restriktionsschnittstellen *Nhe I* und *Not I* exzisiert (siehe Abb. 3.3.14). Die Expressionskassette wurde über ein präparatives Agarosegel (2.3.8) vom Vektorhintergrund getrennt und aufgereinigt (2.3.9). Das unter 3.3.1.3 beschriebene Plasmid pFascin wurde über *Nhe I* und *Not I* linearisiert. Die Expressionskassette konnte nun über die passenden Restriktionsenden in den pFascin-Vektor ligiert werden, so dass das Konstrukt pFascin-IL-10-IRES-cOVA entstand (Abb. 3.3.15).

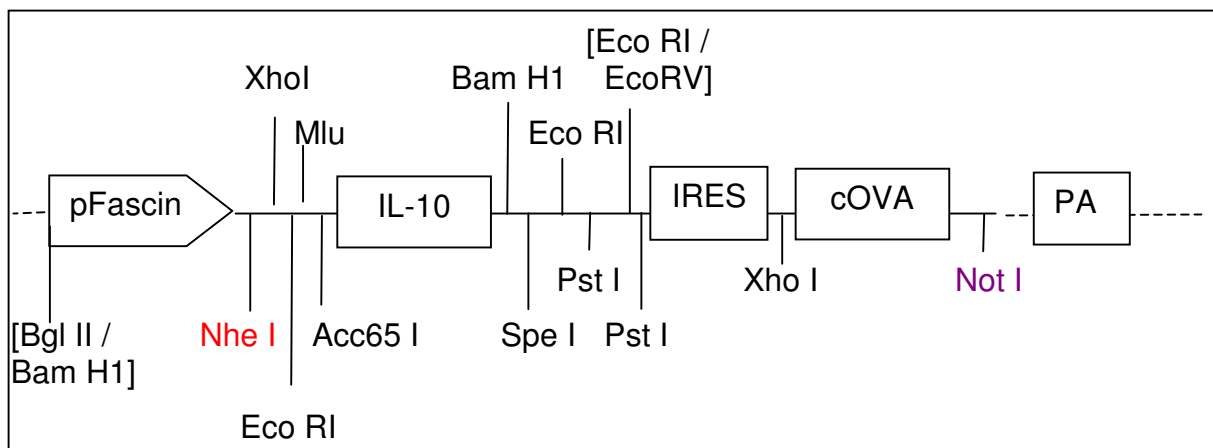


Abb. 3.3.15 : Konstruktskizze von pFascin-IL-10-IRES-cOVA

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pFascin-IL-10-IRES-cOVA auf dem Vektorhintergrund von pCI. Das Expressionskonstrukt beinhaltet das Ampicillinresistenzgen. Eingezeichnet sind die Restriktionsschnittstellen *Nhe I* (rot) und *Not I* (violett), über welche die Expressionskassette IL-10-IRES-cOVA in den linearisierten pFascin-Vektor ligiert worden war. Außerdem sind alle weiteren Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die für eventuelle Klonierungen auf Basis dieses Konstrukts relevant sind. Inaktivierte Schnittstellen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet.

3.3.1.8 Klonierung von pFascin-IL-10

Aus dem vorliegenden Expressionsplasmid pCMV-IL-10 (Abb. 3.3.13) auf pCI-Hintergrund wurde IL-10 über die Restriktionsschnittstellen *Nhe I* und *Xmn I* exzisiert. Der unter 3.3.1.3 beschriebene Vektor pFascin (Abb. 3.3.10) wurde ebenfalls mit *Nhe I* und *Xmn I* restringiert. Die Restriktionsansätze wurden komplett auf ein Agarosegel aufgetragen (2.3.8) und die Fragmente mit den Größen 2,2 kb (aus pCMV-IL-10) und 4,1 kb (aus pFascin) wurden aus dem Gel eluiert (2.3.9). Die beiden Fragmente wurden nun direkt über ihre passenden Restriktionsenden ligiert und es entstand das Konstrukt pFascin-IL-10 (Abb. 3.3.16).

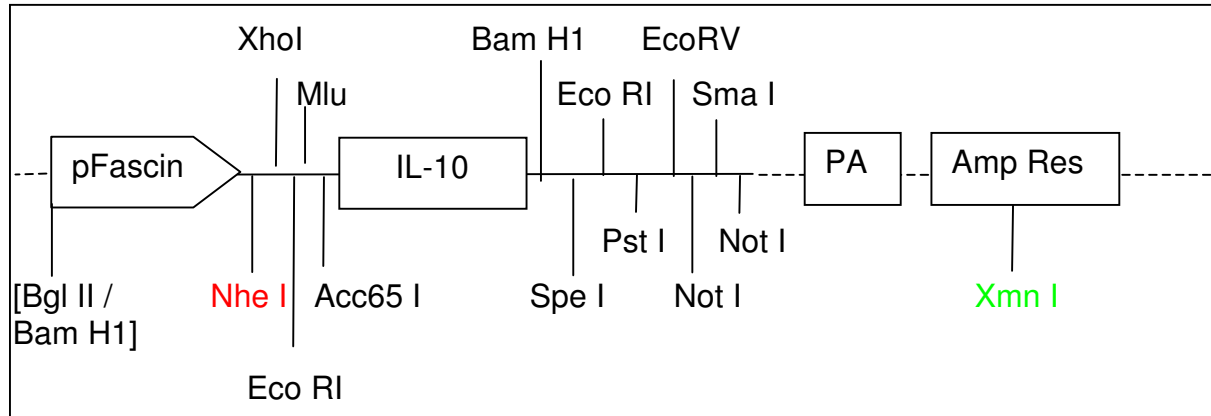


Abb. 3.3.16: Konstruktskizze von pFascin-IL-10

Die Abbildung zeigt das Endkonstrukt pFascin-IL-10 auf dem Vektorhintergrund von pCI mit den eingezeichneten Restriktionsschnittstellen Nhe I (rot) und Xmn I (grün), über die die Fragmente, die den Fascinpromoter und das IL-10-Gen enthielten, ligiert wurden. Außerdem sind alle weiteren Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die für eventuelle Klonierungsmaßnahmen auf Basis dieses Konstrukts relevant sind. Inaktivierte Schnittstellen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet.

3.3.2 Analysen zur Funktionalität von IL-10- und TGF β -kodierenden Expressionsplasmiden

Um die Funktionalität der unter 3.3.1 beschriebenen Expressionsplasmide zu überprüfen, wurden zunächst NIH-3T3-Zellen *in vitro* mit diesen Konstrukten transfiziert (2.3.13) und verschiedenen Expressionsanalysen unterzogen. NIH-3T3-Zellen sind fascin-exprimierende Tumorzellen, die sowohl Gene, die unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promoters stehen als auch Gene, die unter der Kontrolle des DC-spezifischen Fascin-Promoters stehen, exprimieren können. Daher eigneten sich diese Zellen gut für die ersten *in vitro*-Funktionsanalysen der unter 3.3.1 beschriebenen Expressionsplasmide.

Die NIH-3T3-Zellen wurden stets mit einem Testplasmid und dem Kontrollplasmid pCMV-EGFP kotransfiziert. Die Kotransfektion von pCMV-EGFP ermöglichte eine Kontrolle der Transfektionsrate. Nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst 72 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Transfizierte Zellen exprimierten nun das Transgen. Nach drei Tagen konnte man im Fluoreszenzmikroskop deutlich grün gefärbte Zellen nachweisen, welche das EGFP exprimierten (Abb. 3.3.17).

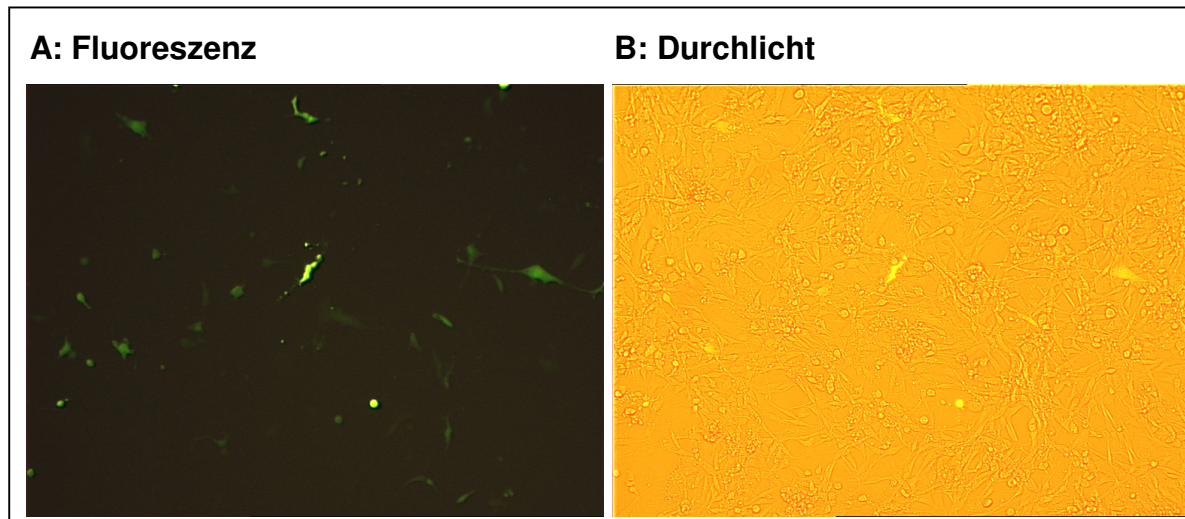


Abb. 3.3.17: Mikroskopische Aufnahme von transfizierten NIH-3T3-Zellen

Die Abbildung zeigt ein mikroskopisches Bild von NIH-3T3-Zellen 72 Stunden nach Kotransfektion von pCMV-TGF β 1-IRES-cOVA und pCMV-EGFP. In der Fluoreszenzaufnahme (A) sieht man deutlich die grün leuchtenden und damit transfizierten Zellen. (B) zeigt denselben Bildausschnitt als Durchlichtaufnahme.

3.3.2.1 Nachweis von IL-10- und TGF β -mRNA durch PCR-Analysen

72 Stunden nach der Transfektion wurden die NIH-3T3-Zellen geerntet und in Lysepuffer aufgenommen. Die RNA wurde isoliert und mittels Reverser Transkription wurde cDNA hergestellt. Von dieser wurden Realtime-PCR-Analysen durchgeführt. Als Kontrolle diente cDNA von untransfizierten NIH-3T3-Zellen.

Bei der Auswertung der Realtime-PCR-Daten wurde die relative IL-10- bzw. TGF β 1-mRNA-Expression der transfizierten Zellen bezogen auf die untransfizierte Kontrolle errechnet.

Die Transfektion mit IL-10-kodierenden Expressionsplasmiden bewirkte ein bis zu 75000-fache Expression von IL-10-mRNA (Abb. 3.3.18 A). Gene, die unter der Kontrolle des Fascin-Promoters kodiert wurden, wurden etwas schwächer exprimiert als Gene, denen der CMV-Promoter vorgeschaltet war. Die Transfektion mit pFascin-IL-10 führte zu einer durchschnittlichen Expressionssteigerung des IL-10-Gens um den Faktor 4000, die Transfektion mit pFascin-IL-10-IRES-cOVA führte zu einer durchschnittlichen Expressionssteigerung des IL-10-Gens um den Faktor 150.

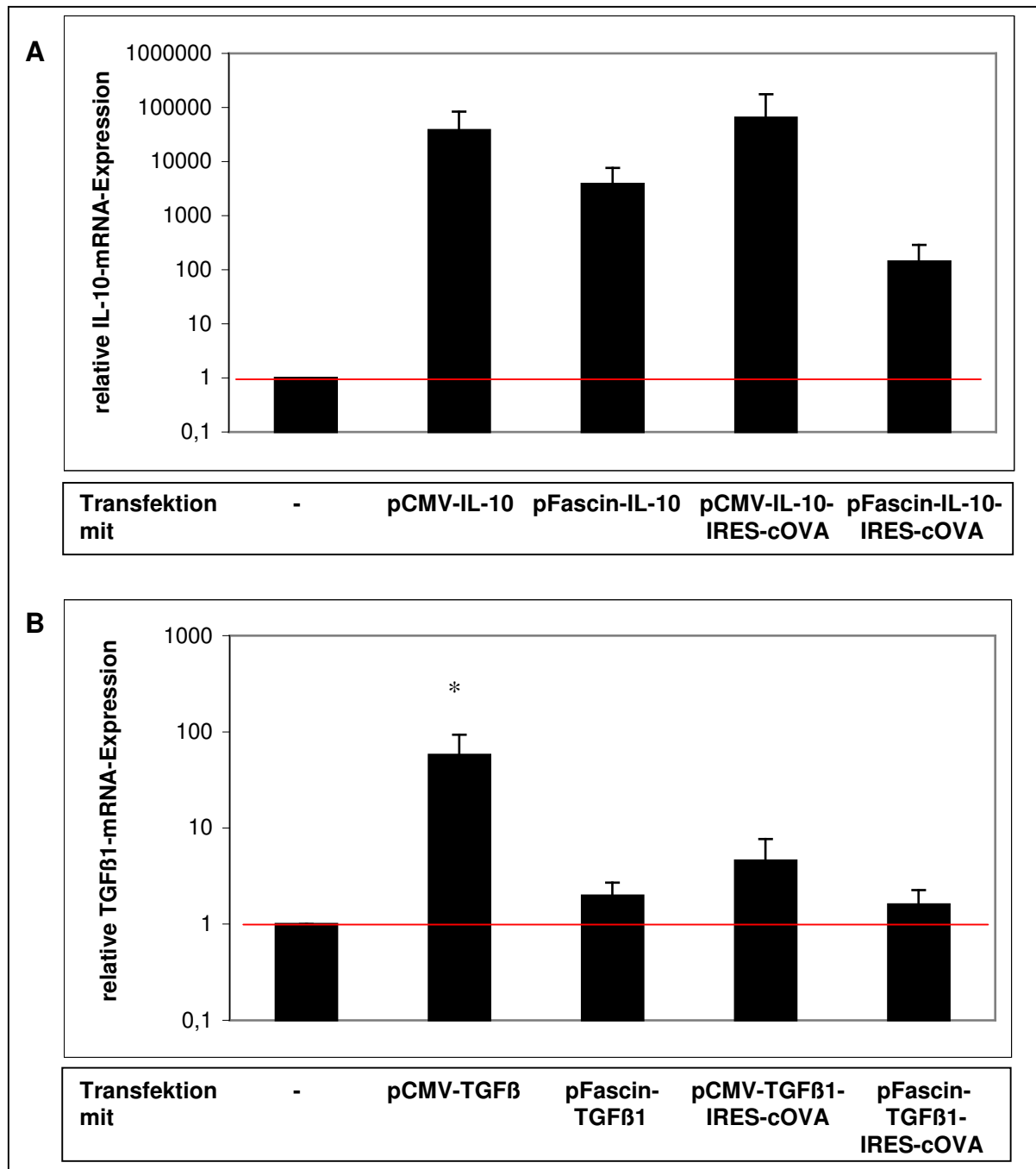


Abb. 3.3.18: Relative IL-10- bzw. TGFβ1-mRNA-Expression von transfizierten NIH-3T3-Zellen
 NIH-3T3-Zellen wurden mit IL-10- (A) bzw. TGFβ1- (B) kodierenden Expressionsplasmiden transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und cDNA hergestellt. Die relative Zytokin-mRNA-Expression von transfizierten versus untransfizierten NIH-3T3-Zellen wurde mittels Realtime-PCR bestimmt. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte +/- SD von vier unabhängig voneinander durchgeführten Transfektionsexperimenten. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den transfizierten und den untransfizierten Zellen sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$).

Die Transfektion mit TGFβ1-kodierenden Expressionsplasmiden bewirkte ebenfalls eine Expressionssteigerung von TGFβ1-mRNA (Abb. 3.3.18 B). Der Effekt war jedoch deutlich schwächer als bei den IL-10-kodierenden Expressionsplasmiden. Es kam nur zu einer durchschnittlichen Expressionssteigerung um den Faktor 60 nach

Transfektion mit pCMV-TGF β 1. Die Transfektion mit Plasmiden, die TGF β 1 unter Kontrolle des Fascin-Promoters kodierten führte nur zu einer ca. zweifach stärkeren TGF β 1-Expression.

In der Darstellung ist auch ein weiteres Phänomen deutlich zu sehen: Die Gene, die unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promoter stehen und durch eine IRES verbunden sind, wurden in drei von vier Fällen schlechter exprimiert als Gene, die ihren eigenen Promoter haben. Dieser expressionshemmende Effekt der IRES trat lediglich bei dem Konstrukt pCMV-IL-10-IRES-cOVA nicht auf.

Die Ergebnisse aus den Abbildungen 3.3.18 A und B zeigen, dass nach Transfektion *in vitro* alle Testkonstrukte abgelesen wurden und somit zumindest auf mRNA-Ebene funktionell sind. Die Transfektion mit IL-10-kodierenden Expressionsplasmiden führte grundsätzlich zu einer stärkeren Expression des Transgens als die Transfektion mit TGF β -kodierenden Expressionsplasmiden. Ferner wurde festgestellt, dass von NIH-3T3-Zellen Gene unter der Kontrolle des CMV-Promoters stärker exprimiert werden als Gene unter der Kontrolle des Fascin-Promoters und dass die durch eine IRES-Sequenz vermittelte Kodierung von zwei Transgenen auf dem gleichen Plasmid die Expressionsstärke des zuerst kodierten Transgens hemmen kann.

3.3.2.2 Nachweis der Zytokinproduktion durch transfizierte NIH-3T3-Zellen

Nachdem die Funktionalität auf mRNA-Ebene nachgewiesen worden war, wurden nun Expressionsanalysen auf Proteinebene durchgeführt. Dazu wurden die Überstände von transfizierten und 72h kultivierten NIH-3T3-Zellen geerntet und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt (Abbildung 3.3.19).

In Kulturüberständen von untransfizierten NIH-3T3-Zellen war kein IL-10 nachweisbar (Abb. 3.3.19 A). Die Detektionsgrenzen für IL-10 lagen in diesen Tests zwischen 0,024 und 0,263 ng/ml. NIH-3T3-Zellen, die mit pCMV-IL-10 transfiziert worden waren, produzierten mit einem durchschnittlichen IL-10-Gehalt von ~110 ng/ml in den Kulturüberständen am meisten IL-10. Bei Transfektion mit Expressionsplasmiden, die das IL-10-Gen unter der Kontrolle des Fascin-Promoters kodierten, fand eine geringere IL-10-Produktion durch die NIH-3T3-Zellen statt. Zellen, die mit pFascin-IL-10 transfiziert worden waren, produzierten unter 5 ng/ml IL-10, in den Kulturüberständen von mit pFascin-IL-10-IRES-cOVA

transfizierten NIH-3T3-Zellen war kein IL-10 nachweisbar. Der inhibierende Effekt der IRES war auch bei der Analyse der IL-10-Produktion deutlich zu sehen. Auf mRNA-Ebene konnte man nach Transfektion mit pCMV-IL-10-IRES-cOVA keine verminderte Expression des IL-10-Gens feststellen (siehe Abb. 3.3.18 A). Auf Proteinebene (Abb. 3.3.19 A) wurde jedoch 65% weniger IL-10 produziert als von den mit pCMV-IL-10 transfizierten Zellen.

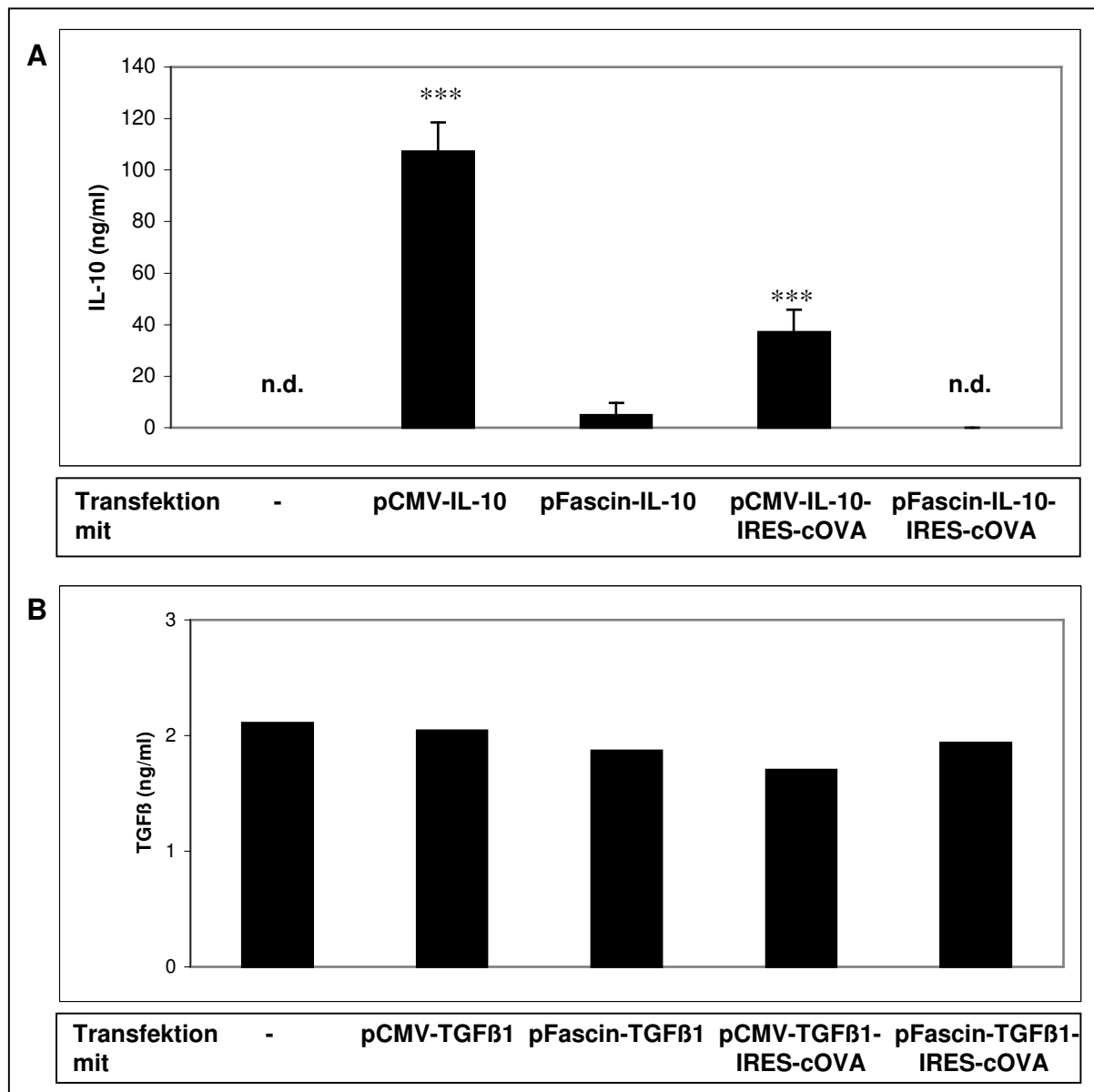


Abb. 3.3.19: IL-10- bzw. TGFβ-Produktion von transfizierten NIH-3T3-Zellen

NIH-3T3-Zellen wurden mit IL-10- (A) oder TGFβ1- (B) kodierenden Expressionsplasmiden transfiziert und 72 Stunden kultiviert. Dann wurden die Überstände geerntet und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung stellt die Mittelwerte \pm SD der IL-10-Konzentrationen von drei unabhängig durchgeführten Transfektionsexperimenten (A) bzw. den TGFβ-Gehalt in den vereinigten Kulturüberständen aus drei unabhängig durchgeführten Transfektionsexperimenten (B) dar. Signifikante Unterschiede in der Zytokinproduktion der transfizierten verglichen mit den untransfizierten Zellen sind mit Sternen gekennzeichnet (*** $p < 0,001$).

In Abbildung 3.3.19 B ist der TGF β -Gehalt in den Kulturüberständen von transfizierten und untransfizierten NIH-3T3-Zellen dargestellt. Es konnten nur geringe TGF β -Mengen nachgewiesen werden und zwischen den TGF β -Mengen in Kulturüberständen von transfizierten und untransfizierten NIH-3T3-Zellen gab es keine signifikanten Unterschiede.

3.3.2.3 *In vivo*-Funktionsanalysen von Expressionsplasmiden

Unter 3.3.2.1 und 3.3.2.2 war die Funktionalität der Expressionsplasmide in verschiedenen *in vitro*-Tests nachgewiesen worden. Für diese Tests war die Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 gewählt worden, da sich die eigentlichen Zielzellen, murine DC, *in vitro* nur schwer transfizieren lassen. Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob eine Transfektion von DC *in vivo* zu einer Expression der plasmidkodierten Gene in diesen Zellen führt. Da sich mit dem Konstrukt pCMV-IL-10 die größte Gen-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene erzielen ließ, wurde dieses Plasmid für die *in vivo*-Teste ausgewählt.

BALB/c-Mäusen wurden fünf nicht überlappende Schüsse à 2 μ g DNA an Goldpartikel gekoppelt mit der Genpistole auf die rasierte Bauchhaut geschossen. Dabei drangen die Goldpartikel in die Epidermis und die Dermis ein und beförderten die Expressionsplasmide direkt in die Hautzellen (Keratinocyten, Langerhanszellen und dermale DC). Da das IL-10-Gen im verwendeten Konstrukt unter Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promoters stand, konnten alle erfolgreich transfizierten Zellen IL-10 exprimieren. Die eigentlichen Zielzellen waren in diesem Versuch jedoch die immunologisch aktiven Langerhanszellen und dermalen DC. Um die Expression des Transgens in diesen Zellen nachzuweisen, wurden die Mäuse 48 Stunden nach der DNA-Immunisierung getötet und die drainierenden inguinalen und axialen Lymphknoten präpariert. Aus den Lymphknotenzellen wurden mittels MACS-Separation CD11c⁺ DC isoliert. Diese wurden in Lysepuffer lysiert und die RNA aufgereinigt. Mittels Reverser Transkription wurde cDNA hergestellt und diese mittels Realtime-PCR analysiert. Kontrollmäuse wurden mit pCMV-EGFP immunisiert. Zum Vergleich diente cDNA aus CD11c⁺ DC aus den drainierenden Lymphknoten dieser Kontrollmäuse.

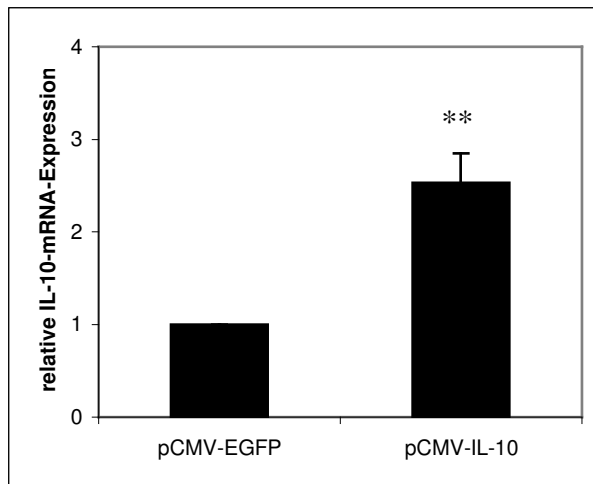


Abb. 3.3.20: Expression von IL-10-mRNA in CD11c⁺ DC von DNA-immunisierten Mäusen

BALB/c-Mäuse (n=5) wurden mittels Genpistole mit pCMV-IL-10 bzw. pCMV-EGFP immunisiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die drainierenden Lymphknoten präpariert. Aus den Lymphknotenzellen wurden mittels MACS-Separation CD11c⁺ DC isoliert und die RNA aus diesen Zellen wurde präpariert und zu cDNA umgeschrieben. Mittels Realtime-PCR wurde die relative IL-10-mRNA-Expression der DC ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Sterne gekennzeichnet (** p < 0,01).

Die IL-10-mRNA-Expression in CD11c⁺ DC aus pCMV-IL-10-immunisierten Mäusen war verglichen mit der IL-10-mRNA-Expression in CD11c⁺ DC aus den mit Kontroll-DNA immunisierten Mäusen um den Faktor 2,5 erhöht (Abb. 3.3.20). Somit konnte nachgewiesen werden, dass das Expressionsplasmid pCMV-IL-10 auch *in vivo* funktionell ist.

3.3.3 Untersuchungen zur Induktion von regulatorischen T-Zellen im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I Allergie durch Vakzinierung mit IL-10- oder TGFβ-kodierenden Plasmiden

In früheren Arbeiten in diesem Labor wurde bereits die DNA-Vakzinierung mit dem β-Galaktosidase (βGal)-kodierenden Plasmid pFascin-βGal im Mausmodell etabliert. Der Fascin-Promoter hat gegenüber dem ubiquitär aktiven CMV-Promoter den Vorteil, dass von allen transfizierten Hautzellen nur Langerhanszellen und dermale DC das Transgen exprimieren können. Somit wird die Modulation der Immunantwort von direkt transfizierten DC induziert und die Kreuzpräsentation über transfizierte Keratinozyten findet nicht statt. Sudowe et al. beschrieben 2003, dass die Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit pFascin-βGal eine starke Th1-Antwort einhergehend mit einer starken IFN-γ-Produktion durch T-Helferzellen in der Milz und den Lymphknoten sowie einer vorherrschenden Produktion von IgG2a in den Seren induzierte [Sudowe et al. 2003]. Außerdem kam es in mit Protein immunisierten Mäusen, die zuvor mit DNA vakziniert worden waren, zu einer inhibierten IgE-Produktion [Ludwig-Portugall et al. 2004].

Durch die Vakzinierung mit pFascin- β Gal kam es also zu einer Inhibition der allergischen Immunantwort. Statt einer Th2-Antwort wurden jedoch starke Th1- und CTL-Antworten induziert, die lokal immunpathologische Effekte haben können.

Ziel dieses Teils der Arbeit war es daher, die Immunantwort durch eine Kombinationsvakzine aus pFascin- β Gal und den Genen für die regulatorischen Zytokine IL-10 und/oder TGF β komplett zu inhibieren oder regulatorische T-Zellen zu induzieren, so dass eine Toleranz gegen das Modellallergen β Gal induziert würde und nicht eine Th1-Antwort. In den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Experimenten wurden zunächst die Effekte der DNA-Immunisierung im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I Allergie auf die antigenspezifische Antikörper-Produktion untersucht. Außerdem wurden Analysen zur Zytokinproduktion von Milz- und Lymphknotenzellen aus DNA-immunisierten Mäusen und der CTL-Induktion in diesen Tieren durchgeführt. Für die durchzuführenden Experimente wurden Patronen für die Genpistole verwendet, die Goldpartikel enthielten, an die eine Mischung aus dem Plasmid pFascin- β Gal sowie IL-10- und/oder TGF β -kodierenden Plasmiden gekoppelt war. Der Einfluss dieser Kombinationsvakzine auf die Immunantwort verglichen mit der Immunisierung mit pFascin- β Gal allein wurde untersucht.

Zunächst wurde der Effekt einer Koapplikation von pCMV-IL-10 oder pFascin-IL-10 zusätzlich zu einer Immunisierung mit pFascin- β Gal untersucht. IL-10-kodierende Plasmide wurden als erstes für die Kombinationsvakzine gewählt, da mit ihnen in den unter 3.3.2 beschriebenen Funktionsanalysen die besten Expressionsergebnisse erzielt worden waren. Im ersten Experiment sollte untersucht werden, ob eine ubiquitäre IL-10-Expression in der Haut, induziert durch pCMV-IL-10 oder eine auf DC fokussierte IL-10-Produktion, herbeigeführt durch die Immunisierung mit pFascin-IL-10, für den Einsatz als Kombinationsvakzine sinnvoller ist. BALB/c-Mäuse wurden dreimal mit pFascin- β Gal bzw. pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 oder pFascin- β Gal/pFascin-IL-10 mittels Genpistole immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die β Gal-spezifischen IgG1- und IgG2a-Titer in den Seren mittels ELISA bestimmt (Abb. 3.3.21). Im Anschluss an diese Serumanalysen wurde die Hälfte der Tiere getötet und die Milzen sowie die inguinalen und axialen Lymphknoten präpariert. Milz- und Lymphknotenzellen wurden 72 Stunden mit und ohne die Zugabe von β Gal kultiviert und die Zytokinmengen in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt

(Abb. 3.3.22). Mit den Milzzellen wurden zusätzlich CTL-ELISpot-Analysen durchgeführt, um die Zahl IFN- γ -produzierender zytotoxischer T-Zellen zu bestimmen (Abb. 3.3.23).

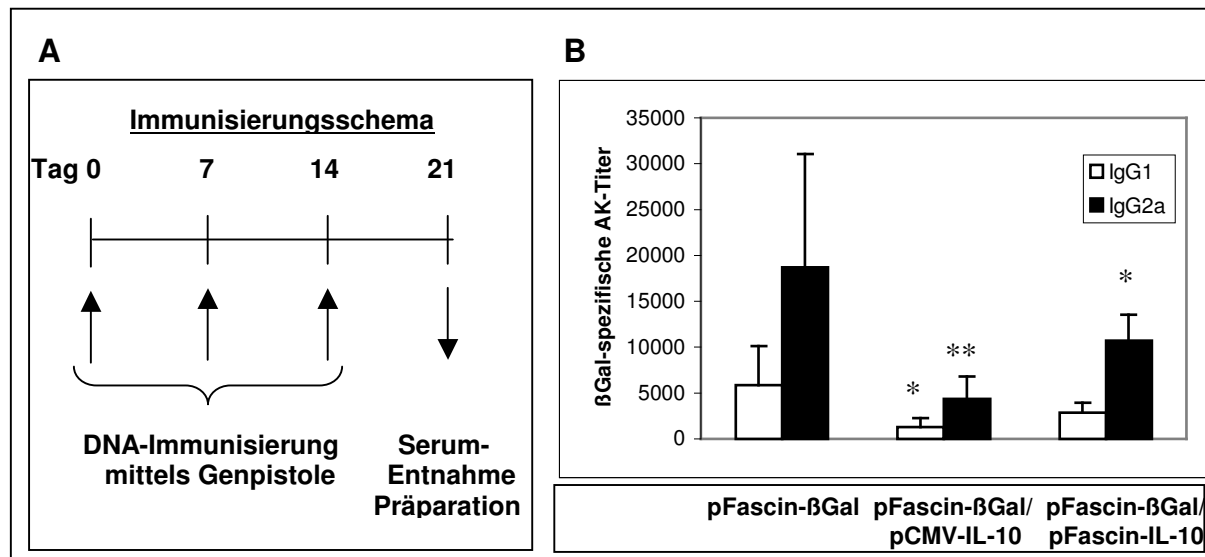


Abb. 3.3.21: Experiment 1: Einfluss einer Koapplikation von IL-10-kodierenden Plasmiden auf die IgG-Produktion nach Immunisierung mit pFascin-βGal

A) BALB/c-Mäuse (n=8) wurden dreimal im Abstand von je einer Woche mit pFascin-βGal bzw. pFascin-βGal/pCMV-IL-10 oder pFascin-βGal/pFascin-IL-10 mit der Genpistole immunisiert. B) Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen und die βGal-spezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörper in den Seren wurden mittels ELISA nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der IgG-Titer individueller Seren. Signifikante Unterschiede der Antikörper-Titer in den mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 oder pFascin-βGal/pFascin-IL-10 immunisierten Mäusen zu den mit pFascin-βGal immunisierten Tieren sind mit Sternen gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

In Abbildung 3.3.21 B ist die Produktion von βGal-spezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörpern nach Immunisierung mit pFascin-βGal bzw. pFascin-βGal/pCMV-IL-10 oder pFascin-βGal/pFascin-IL-10 dargestellt. Die Immunisierung mit den Kombinationsvakzinen bewirkte eine geringere βGal-spezifische IgG1- und IgG2a-Produktion als die Immunisierung mit pFascin-βGal allein. In mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 immunisierten Tieren waren die Titer beider Immunglobulinklassen um ~80%, in mit pFascin-βGal/pFascin-IL-10 immunisierten Mäusen um die Hälfte verglichen mit den Titern der mit pFascin-βGal immunisierten Gruppe reduziert. Die Immunisierung mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 führte also zu der geringsten Produktion von βGal-spezifischen IgG-Antikörpern.

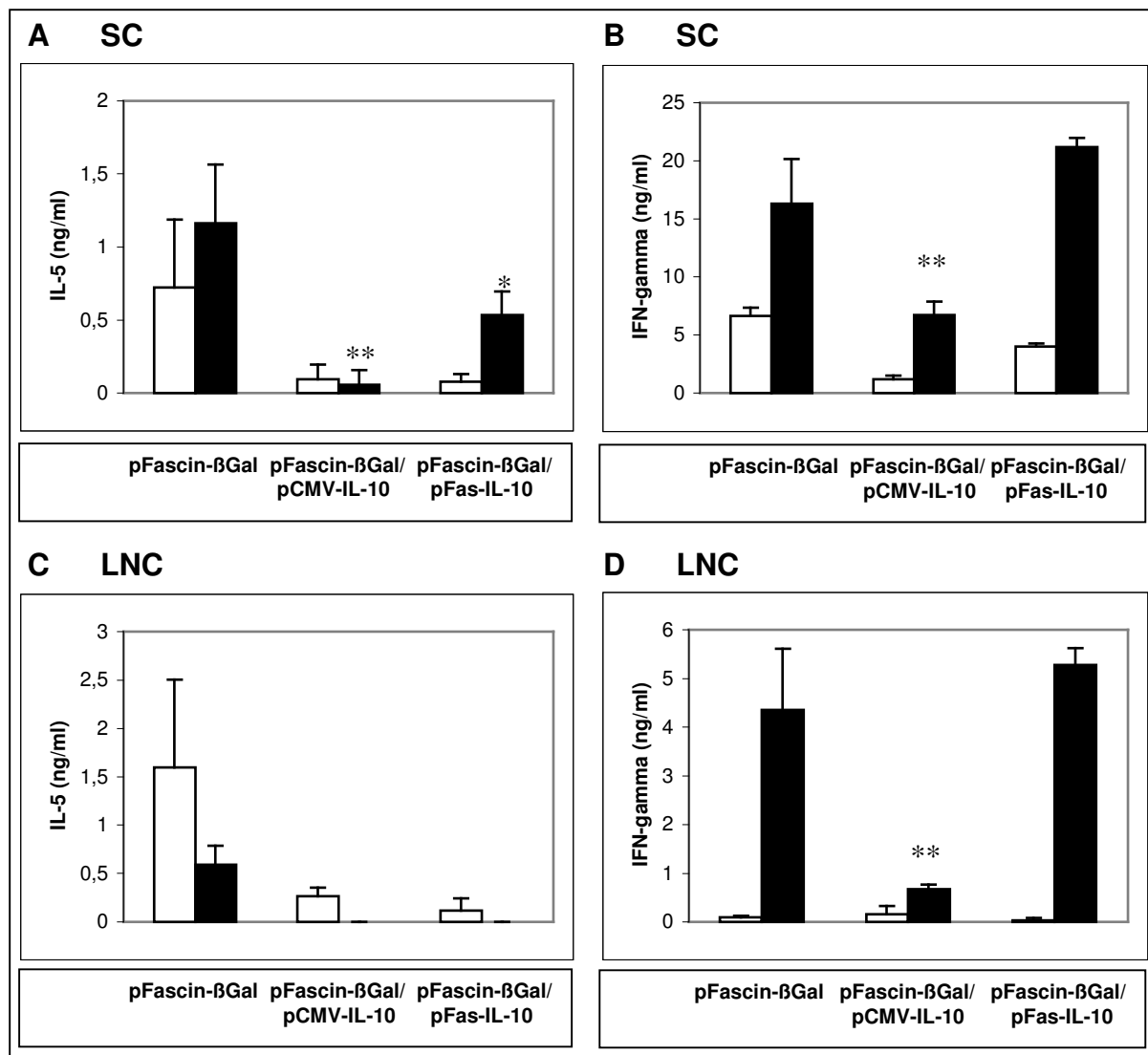


Abb. 3.3.22: IL-5- und IFN- γ -Produktion von Milz- und Lymphknotenzellen nach Restimulation *in vitro*: Einfluss einer Koapplikation von IL-10-kodierenden Plasmiden auf die Zytokinproduktion nach Immunisierung mit pFascin- β Gal

BALB/c-Mäuse ($n=4$) wurden dreimal im Abstand von je einer Woche mit pFascin- β Gal bzw. pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 oder pFascin- β Gal/pFascin-IL-10 mit der Genpistole immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die Milz- (A und B) und Lymphknotenzellen (C und D) isoliert und ohne (weiße Balken) bzw. mit 25 μ g/ml β Gal (schwarze Balken) kultiviert. Die Mengen der Zytokine IL-5 und IFN- γ in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Zytokinkonzentrationen in den Überständen aus je vier Kulturen. Signifikante Unterschiede zwischen den mit pFascin- β Gal immunisierten Mäusen und den mit pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 oder pFascin- β Gal/pFascin-IL-10 immunisierten Tieren sind mit Sternen gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Als nächstes wurden die Milz- und Lymphknotenzellen aus den mit pFascin- β Gal bzw. pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 oder pFascin- β Gal/pFascin-IL-10 immunisierten Mäusen isoliert, 72 Stunden stimuliert und die Zytokinmengen in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt (Abb. 3.3.22). Die Analyse der Zytokinproduktion ergab, dass die Immunisierung mit pFascin- β Gal zu einer starken antigenspezifischen Produktion des Th1-Zytokins IFN- γ durch Milz- und

Lymphknotenzellen führte. Das Th2-Zytokin IL-5 wurde in den Überständen von Milz- und Lymphknotenzellkulturen dagegen nur in äußerst geringer Konzentration nachgewiesen. Die DNA-Immunisierung mit pFascin-βGal induzierte also eine eher Th1-polarisierte Antwort.

Auch nach Immunisierung mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 oder pFascin-βGal/pFascin-IL-10 wurden eine Th1-gerichtete Zytokinproduktion durch Milz- und Lymphknotenzellen nachgewiesen. Die Milz- und Lymphknotenzellen produzierten nach Restimulation *in vitro* jedoch kaum oder gar kein IL-5 (Detektionsgrenze für IL-5: 0,076 ng/ml). Die Immunisierung mit pFascin-βGal/pFascin-IL-10 führte, wie die Immunisierung mit pFascin-βGal allein, zu einer starken Induktion der IFN-γ-Produktion durch restimierte Milz- und Lymphknotenzellen. Nach Vakzinierung mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 wurde signifikant weniger IFN-γ in stimulierten Milz- und Lymphknotenzellkulturen gebildet als nach Vakzinierung mit pFascin-βGal allein. Milzzellen aus mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 immunisierten Mäusen produzierten ~60%, Lymphknotenzellen ~85% weniger IFN-γ als die entsprechenden Zellen aus den mit pFascin-βGal immunisierten Tieren. Die Immunisierung mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 führt also anscheinend weder zu einer Induktion einer Th2- noch zu einer starken Induktion einer Th1-Zytokinantwort.

Die Resultate aus den Analysen der βGal-spezifischen IgG-Produktion und den Bestimmungen der Zytokinproduktion nach Restimulation von Milz- und Lymphknotenzellen *in vitro* führen zu der Beobachtung, dass die Th1-Antwort in mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 immunisierten Tieren abgeschwächt ist.

Außerdem wurden mit den Milzzellen CTL-ELISpot-Analysen durchgeführt. Abbildung 3.3.23 stellt dar, dass die Immunisierung mit pFascin-βGal große Mengen IFN-γ-produzierende zytotoxische T-Zellen induziert (~100 CTL/2x10⁵ Milzzellen). Durch die Koapplikation von pFascin-IL-10 wurde die Induktion zytotoxischer T-Zellen sogar noch gesteigert (~125 CTL/2x10⁵ Milzzellen). Der Unterschied in der CTL-Induktion nach Immunisierung mit pFascin-βGal allein oder nach Immunisierung mit pFascin-βGal/pFascin-IL-10 war jedoch nicht signifikant.

Die Koapplikation von pCMV-IL-10 führte hingegen zu einer signifikant verminderten CTL-Induktion (~60 CTL/2x10⁵ Milzzellen). In der mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 immunisierten Gruppe war die Induktion IFN-γ-produzierender zytotoxischer

T-Zellen gegenüber der mit pFascin-βGal immunisierten Gruppe um ca. 30% reduziert.

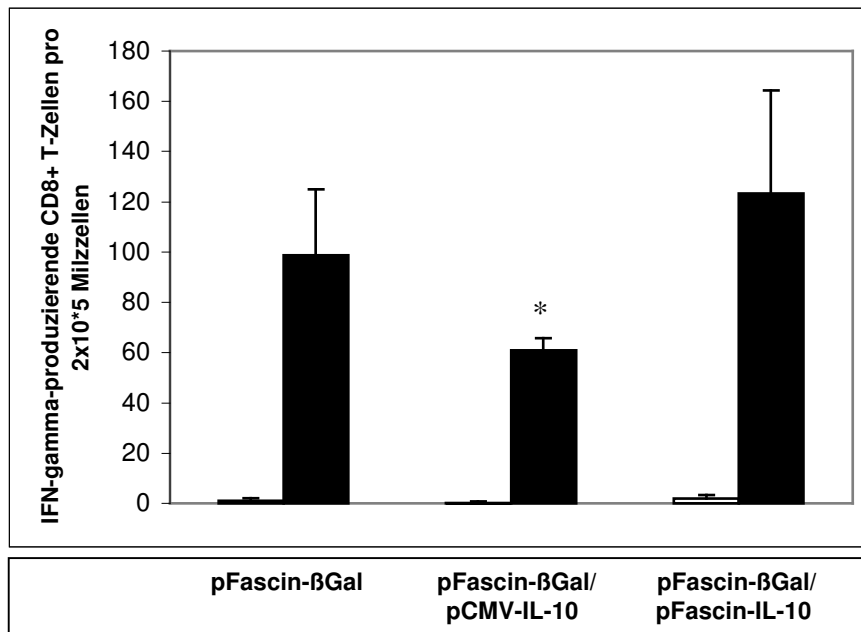


Abb. 3.3.23: Einfluss einer Koapplikation von IL-10-kodierenden Plasmiden auf die Induktion IFN-γ-produzierender zytotoxischer T-Zellen nach Immunisierung mit pFascin-βGal

BALB/c-Mäuse (n=4) wurden dreimal im Abstand von je einer Woche mit pFascin-βGal bzw. den Kombinationsvakzinen pFascin-βGal/pCMV-IL-10 oder pFascin-βGal/pFascin-IL-10 mit der Genpistole immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und die Anzahl IFN-γ-produzierender CD8⁺ T-Zellen wurde mittels ELISpot ermittelt. Dazu wurde 2x10⁵ Milzzellen auf ELISpot-Mikrotiterplatten, die mit anti-IFN-γ-Antikörpern beschichtet worden waren mit (schwarze Balken) und ohne (weiße Balken) die Zugabe von βGal-Peptid TPHPARIGL (1 μg/ml) kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD von Quadruplikaten. Signifikante Unterschiede in der CTL-Anzahl in mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 oder pFascin-βGal/pFascin-IL-10 immunisierten Mäusen verglichen mit der CTL-Anzahl in der mit pFascin-βGal immunisierten Gruppe sind durch Sterne gekennzeichnet (* p < 0,05).

Durch die Koapplikation von pCMV-IL-10 ließen sich die stärksten inhibitorischen Effekte auf die durch die Immunisierung mit pFascin-βGal induzierte Antikörperproduktion, Th2- und Th1-Zytokinproduktion durch restimulierte Milz- und Lymphknotenzellen sowie CTL-Induktion erzielen. Für die weiterführenden Experimente wurde daher pFascin-βGal mit pCMV-IL-10 kombiniert. Außerdem wurden die Kombinationsvakzine pFascin-βGal/pCMV-TGFβ1 und pFascin-βGal/pCMV-IL-10/pCMV-TGFβ1 verwendet, um zu untersuchen, ob sich auch durch die Koapplikation eines TGFβ-kodierenden Plasmids suppressive Effekte auf die durch pFascin-βGal induzierte Immunantwort erzielen lassen und ob sich die Effekte einer Koapplikation von pCMV-IL-10 und pCMV-TGFβ1 addieren lassen.

Des Weiteren wurden Kontrollpartikel hergestellt, die pFascin-βGal in Kombination mit dem Leervektor pCI bzw. den irrelevanten Konstrukten pCMV-EGFP oder pFascin-EGFP trugen. Auf diesen Goldpartikeln ist pFascin-βGal mit „Platzhaltern“ in verschiedenen Größen gekoppelt. Diese Kontrollen wurden kreiert, da durch die Beladung mit einer Kombination aus pFascin-βGal und IL-10- und/oder TGFβ-kodierenden Plasmiden möglicherweise Goldpartikel entstehen könnten, die weniger βGal-DNA tragen als Goldpartikel, an die nur pFascin-βGal gekoppelt war. Um auszuschließen, dass ein potenzieller inhibitorischer Effekt auf die Antikörperproduktion lediglich auf die unterschiedliche Beladungsdichte der Goldpartikel mit dem βGal-Gen zurückzuführen ist, wurde zunächst untersucht, ob die Immunisierung mit den Kontrollplasmiden zu einer verminderten Immunantwort im Vergleich zu der Immunisierung mit pFascin-βGal allein führt. Dazu wurden BALB/c-Mäuse dreimal mit pFascin-βGal bzw. den Kontrollkombinationen pFascin-βGal/pCI, pFascin-βGal/pCMV-EGFP und pFascin-βGal/pFascin-EGFP immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen und die βGal-spezifischen IgG1- und IgG2a-Titer mittels ELISA bestimmt. Alle Plasmide scheinen für den Einsatz im Rahmen von Kontrollimmunisierungen geeignet zu sein, da die βGal-spezifischen IgG1- und IgG2a-Titer der Tiere nicht signifikant von den Titern der allein mit pFascin-βGal immunisierten Gruppe abwichen (Daten nicht gezeigt).

In den folgenden Versuchen wurden daher nicht nur Mäuse mit pFascin-βGal bzw. den Kombinationsvakzinen pFascin-βGal/pCMV-IL-10, pFascin-βGal/pCMV-TGFβ1 und pFascin-βGal/pCMV-IL-10/pCMV-TGFβ1 vakziniert, sondern es wurde auch immer eine Kontrollgruppe mitgeführt, die mit pFascin-βGal in Kombination mit einem der Kontrollplasmide vakziniert wurde.

Um den Effekt der alleinigen Immunisierung mit pFascin-βGal mit den Effekten der Kombinationsvakzine pFascin-βGal/pCMV-IL-10, pFascin-βGal/pCMV-TGFβ1 und pFascin-βGal/pCMV-IL-10/pCMV-TGFβ1 zu vergleichen, wurden drei Experimente durchgeführt, in denen BALB/c-Mäuse, wie in dem in Abbildung 3.3.21 A dargestellten Immunisierungsschema, dreimal im Abstand von je einer Woche mit den verschiedenen Expressionsplasmiden mittels Genpistole immunisiert wurden. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen und die βGal-spezifischen IgG1- und IgG2a-Mengen in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt (Abb. 3.3.24).

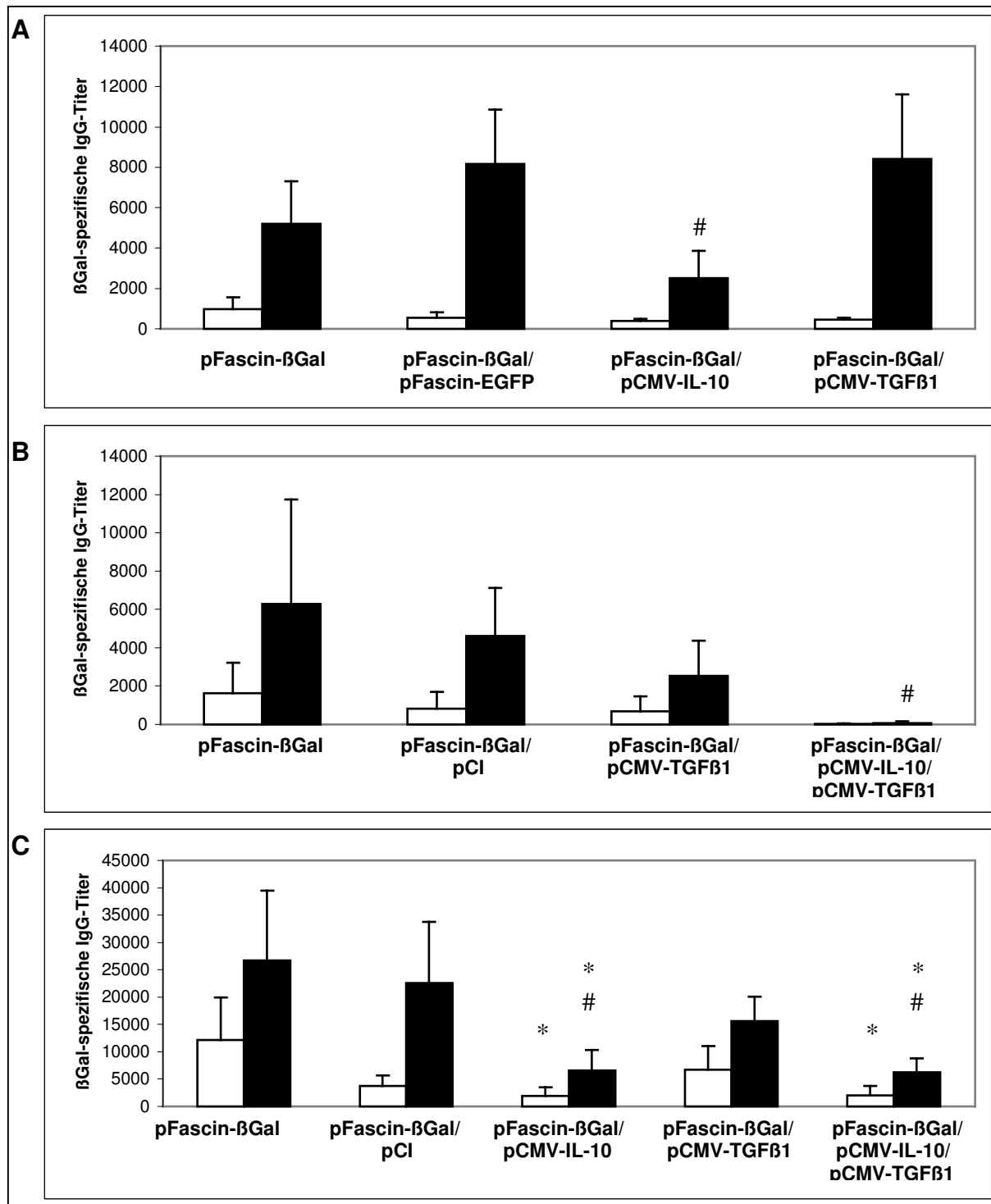


Abb. 3.3.24: Einfluss einer Koapplikation von IL-10- und/oder TGFβ-kodierenden Plasmiden auf die IgG1- und IgG2a-Produktion nach Immunisierung mit pFascin-βGal

Die Abbildungen A, B und C stellen drei voneinander unabhängige Versuche dar. Im Zuge dieser Experimente wurden BALB/cJ-Mäuse (n=4) dreimal im Abstand von je 1 Woche mit den angegebenen Expressionsplasmiden mittels Genpistole immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die Seren der Versuchsmäuse gewonnen und die Titer der βGal-spezifischen IgG1- (□) und IgG2a-Antikörper (■) mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der βGal-spezifischen Antikörpertiter individueller Seren. Signifikante Unterschiede zwischen den Antikörpertitern der mit pFascin-βGal immunisierten Mäuse und den Titern der mit den Kombinationsvakzinen immunisierten Tieren sind mit Sternen gekennzeichnet (* $p < 0,05$). Signifikante Unterschiede zwischen den Antikörpertitern der mit pFascin-βGal/pFascin-EGFP (A) bzw. pFascin-βGal/pCI (B + C) immunisierten Mäuse und den Titern der mit den Kombinationsvakzinen immunisierten Tieren sind mit Rauten gekennzeichnet (# $p < 0,05$).

Die Immunisierung mit pFascin-βGal induzierte eine starke antigenspezifische IgG-Produktion, wobei der vorherrschende Isotyp das IgG2a war (Abb. 3.3.24 A-C). Auch nach Immunisierung mit den Kombinationsvakzinen wurde die Produktion von βGal-spezifischen IgG-Antikörpern induziert und es wurde deutlich mehr IgG2a als IgG1 in den Seren nachgewiesen. Die Immunisierung mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 (Abb. 3.3.24 A und C) und pFascin-βGal/pCMV-IL-10/pCMV-TGFβ1 (Abb. 3.3.24 B und C) führte jedoch zu einer signifikant geringeren antigenspezifischen Antikörperproduktion als die Immunisierung mit pFascin-βGal allein oder in Kombination mit einem Kontrollplasmid. Die IgG1-Induktion nach Immunisierung mit den IL-10-kodierenden Kombinationsvakzinen war verglichen mit der Induktion durch pFascin-βGal/Kontrollplasmid um A: ~27%, B: ~96%, C: ~48%, die Induktion der antigenspezifischen IgG2a-Produktion um A: ~69%, B: ~98%, C: ~72% reduziert. Im Gegensatz dazu führte die Immunisierung mit pFascin-βGal/pCMV-TGFβ1 nicht zu einer signifikanten Inhibition der IgG1- und IgG2a-Produktion (Abb. 3.3.24 A-C). Die Koapplikation von pCMV-TGFβ1 mit dem IL-10-kodierenden Plasmid führte nicht zu einer stärkeren Suppression der Antikörperproduktion als die Immunisierung mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 (Abb. 3.3.24 C). Allerdings war die Expression des Plasmids pCMV-TGFβ1 auch in den *in vitro*-Experimenten nicht sehr effizient (siehe Abb. 3.3.18 B: TGFβ-mRNA-Expression und 3.3.19 B: TGFβ-Proteinexpression).

In der nächsten Versuchsreihe wurde die Effizienz einer Vakzinierung mit pFascin-βGal bzw. den IL-10- oder TGFβ-kodierenden Kombinationsvakzinen bei der Inhibition von Immunantworten im Mausmodell der IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion untersucht.

Zunächst wurde anhand der zweiten Hälfte der in Experiment 1 mit pFascin-βGal bzw. pFascin-βGal/pCMV-IL-10 oder pFascin-βGal/pFascin-IL-10 vakzinieren Mäuse untersucht, ob die Koapplikation eines IL-10-kodierenden Plasmids zusätzlich zu einer Immunisierung mit pFascin-βGal inhibitorisch auf die Antikörperproduktion, die Zytokinproduktion und die CTL-Induktion in Mäusen wirkt, die nach der DNA-Vakzinierung mit βGal-Protein sensibilisiert wurden. Dazu wurden die Tiere zwei Wochen nach der letzten DNA-Vakzinierung fünfmal im Abstand von je 14 Tagen mit 1 µg βGal adsorbiert an Alum intraperitoneal immunisiert (Abb. 3.3.25: Immunisierungsschema, Abbildung 3.3.21: Antikörpernachweis nach der DNA-Vakzinierung). Vier nicht vakzinieren BALB/c-Mäuse wurden ebenfalls mit

β Gal sensibilisiert. Nach der ersten (Tag 7), dritten (Tag 35) und fünften (Tag 63) Sensibilisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen und die β Gal-spezifischen IgG1- und IgG2a-Titer in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt (siehe Abb. 3.3.26 A). In den Seren, die nach der dritten (Tag 35) und fünften (Tag 63) Immunisierung gewonnen wurden, wurden zudem β Gal-spezifische IgE-Antikörper nachgewiesen (siehe Abb. 3.3.26 B).

Des Weiteren wurden die Milzen sowie die drainierenden Lymphknoten präpariert. Milz- und Lymphknotenzellen wurden 72 Stunden mit und ohne die Zugabe von β Gal kultiviert und die Zytokinkonzentrationen in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt (Abb. 3.3.27). Mit den Milzzellen wurden außerdem CTL-ELISpot-Analysen durchgeführt (Abb. 3.3.28).

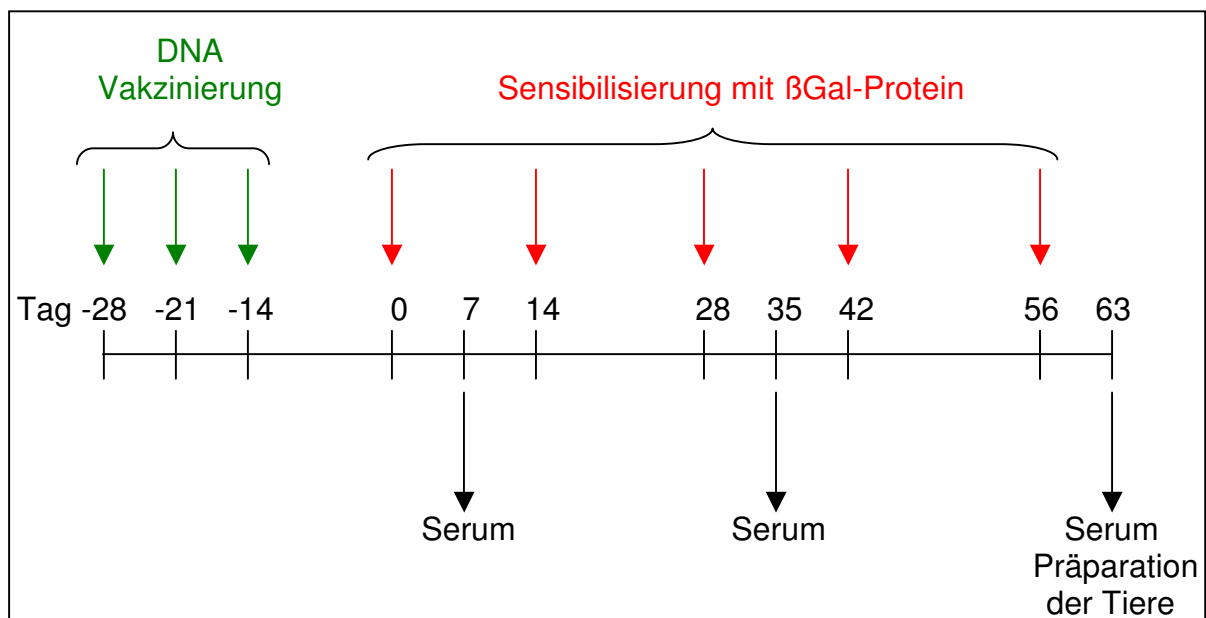


Abb. 3.3.25: Immunisierungsschema

BALB/c-Mäuse ($n=4$) wurden an Tag -28, -21 und -14 mit pFascin- β Gal bzw. den Kombinationsvakzinen pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 und pFascin- β Gal/pFascin-IL-10 mittels Genpistole immunisiert (grün). An Tag -7 wurden die Seren der Versuchsmäuse genommen und die β Gal-spezifischen IgG1- und IgG2a-Titer mittels ELISA bestimmt. Ab Tag 0 wurden die Tiere repetitiv alle 14 Tage mit $1 \mu\text{g}$ β Gal adsorbiert an Alum sensibilisiert (rot). An den Tagen 7, 35 und 63 wurden die Seren genommen und die β Gal-spezifischen IgG1-, IgG2a-Titer wurden mittels ELISA bestimmt. In den Seren der Tage 35 und 63 wurden außerdem β Gal-spezifische IgE-Antikörper nachgewiesen. An Tag 63 wurden die Versuchstiere getötet und die Milzen und die drainierenden Lymphknoten präpariert. Milz- und Lymphknotenzellen wurden für 72 Stunden *in vitro* restimuliert und die Zytokinkonzentrationen in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt. Die Anzahl IFN- γ -produzierender CD8⁺ T-Zellen wurde mittels ELISpot ermittelt.

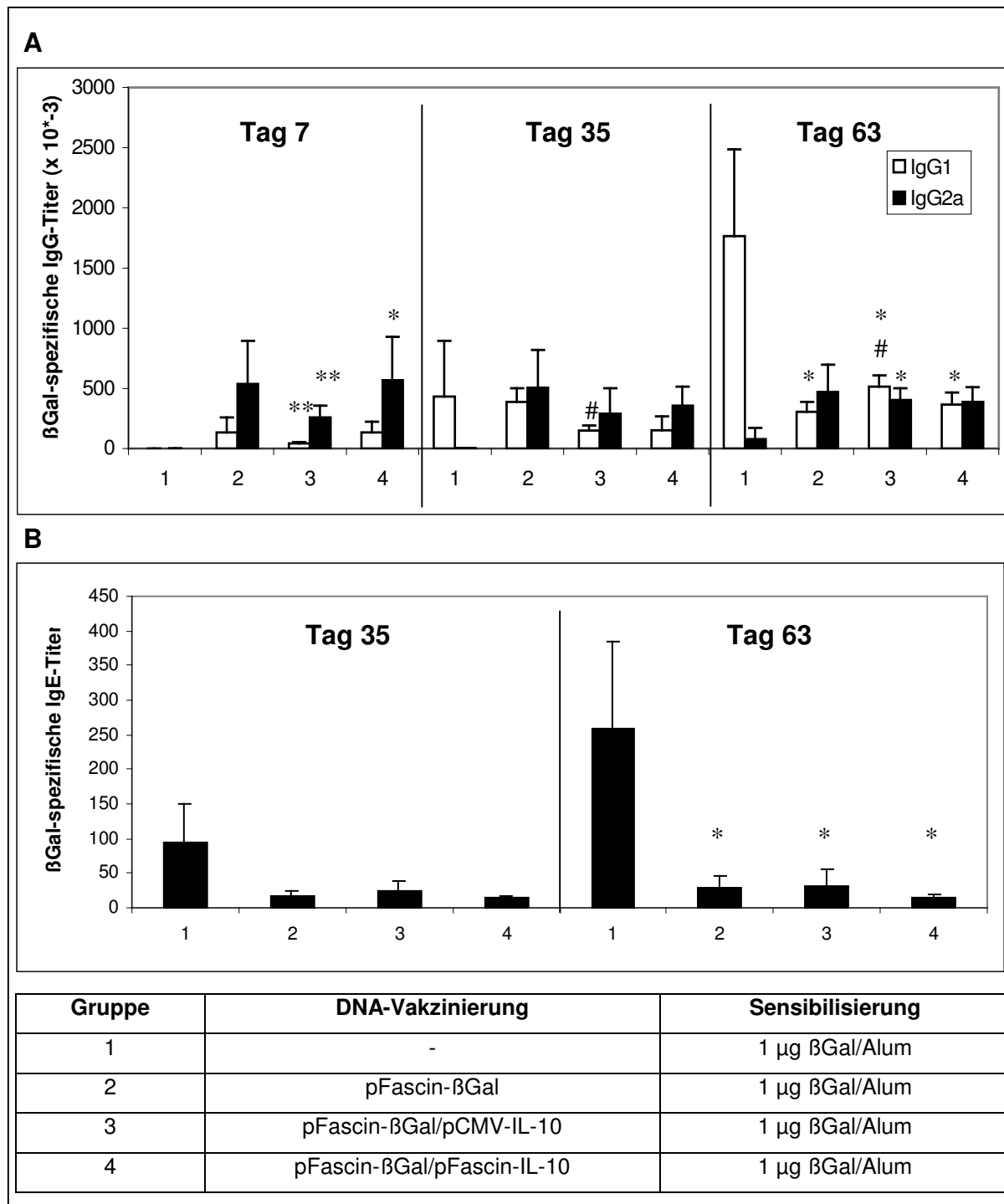


Abb. 3.3.26: Experiment 1, Teil 2: Einfluss einer Kovakzinierung mit IL-10-kodierenden Plasmiden auf den Effekt der Vakzinierung mit pFascin-βGal im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I Allergie

BALB/cJ-Mäuse (n=4) wurden dreimal mit pFascin-βGal bzw. pFascin-βGal/pCMV-IL-10 und pFascin-βGal/pFascin-IL-10 mittels Gempistole immunisiert. 14 Tage nach der letzten Vakzinierung wurden diese Mäuse sowie nicht vakzinierter Kontrolltiere durch wiederholte Immunisierung mit 1 µg βGal/Alum sensibilisiert. An den dargestellten Zeitpunkten wurden die Seren der Versuchsmäuse genommen und die βGal-spezifischen IgG1- und IgG2a- (A) sowie IgE- (B) Antikörpertiter mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD der Antikörpertiter individueller Seren. Signifikante Unterschiede der βGal-spezifischen Antikörpertiter von den vakzinierter Gruppen verglichen mit der unvakzinierter Gruppe sind mit Sternen gekennzeichnet (* p < 0,05, ** p < 0,01). Signifikante Unterschiede der βGal-spezifischen Antikörpertiter zwischen der mit pFascin-βGal vakzinierter Gruppe und den mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 oder pFascin-βGal/pFascin-IL-10 vakzinierter Gruppen sind mit Rauten gekennzeichnet (# p < 0,05).

In Abbildung 3.3.26 ist die β Gal-spezifische Antikörperproduktion in unvakzinierten und DNA-vakzinierten Mäusen nach den verschiedenen Sensibilisierungszeitpunkten dargestellt. Die wiederholte Immunisierung mit β Gal-Protein adsorbiert an Alum führte in den nicht vakzinierten Mäusen zu einem raschen Anstieg der β Gal-spezifischen IgG1- und IgE-Produktion, während auch nach mehreren Applikationen von β Gal-Protein nur wenig antigenspezifisches IgG2a induziert wurde. In den Mäusen, die mit pFascin- β Gal allein vakziniert worden waren, wurden nach einer i.p. Immunisierung hauptsächlich antigenspezifische IgG2a-Antikörper nachgewiesen. Dieser hohe IgG2a-Titer blieb bei fortschreitender Sensibilisierung immer ungefähr gleich. Während nach der ersten i.p. Immunisierung nur geringe β Gal-spezifische IgG1-Mengen in den Seren von mit pFascin- β Gal vakzinierten Mäusen gemessen wurden, stiegen die IgG1-Titer in diesen Mäusen mit fortschreitender Sensibilisierung stark an. Nach der dritten Immunisierung produzierten Mäuse, die mit pFascin- β Gal vakziniert worden waren, ähnliche Mengen IgG1 wie die unvakzinierten Tiere, bis nach der fünften Protein-Immunisierung kam es jedoch nicht zu einem weiteren Anstieg der IgG1-Produktion. Verglichen mit den IgG1-Titern, die nach der ersten Protein-Immunisierung in den Seren der mit pFascin- β Gal vakzinierten Tiere gemessen wurden, hatte sich die Menge der antigenspezifischen IgG1-Antikörper nach der fünften Protein-Immunisierung verdreifacht und das IgG2a:IgG1-Verhältnis hatte sich von anfänglich 4:1 zu 1,5:1 verschoben. Diese vakzinierten Tiere produzierten jedoch signifikant weniger (~83%) β Gal-spezifisches IgG1 als die unvakzinierten Tiere.

Auch in den mit pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 oder pFascin- β Gal/pFascin-IL-10 vakzinierten Mäusen war die β Gal-spezifische Antikörperproduktion nach einer i.p. Immunisierung noch signifikant höher als in den unvakzinierten Tieren. Der vorherrschende Isotyp war IgG2a. Die Koapplikation von pCMV-IL-10 führte dazu, dass weniger IgG1 (~67%) und IgG2a (~52%) produziert wurde als nach Vakzinierung mit pFascin- β Gal allein. Die Koapplikation von pFascin-IL-10 hatte hingegen keinen Effekt auf die Antikörperproduktion. Nach drei i.p. Immunisierungen war die β Gal-spezifische IgG1-Produktion in den mit pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 vakzinierten Mäusen verglichen mit der IgG1-Produktion in den mit pFascin- β Gal allein vakzinierten Mäusen signifikant reduziert (um ~62%). Auch die IgG2a-Produktion war um ca. 38% reduziert. Die Koapplikation von pFascin-IL-10 führte ebenfalls zu einer reduzierten IgG1- (60%) und IgG2a- (30%) Produktion verglichen

mit den Tieren, die mit pFascin- β Gal allein vakziniert worden waren. Der vorherrschende Isotyp in allen vakzinierten Tieren war noch das IgG2a, die IgG1-Produktion stieg jedoch langsam an. Nach fünf i.p. Immunisierungen war die β Gal-spezifische IgG1-Produktion in allen vakzinierten Mäusen verglichen mit der IgG1-Produktion in den unvakzinierten Tieren signifikant reduziert. Die vakzinierten Mäuse produzierten nun ungefähr gleich große Mengen IgG1 und IgG2a. Die Koapplikation von pCMV-IL-10 führte zu einer signifikanten Steigerung der IgG1-Produktion um ~40% verglichen mit der Vakzinierung mit pFascin- β Gal allein. Nicht vakzinierte Mäuse produzierten nach wiederholter Immunisierung mit β Gal-Protein adsorbiert an Alum große Mengen β Gal-spezifischer IgE-Antikörper (Abb. 3.3.25 B). Die antigenspezifische IgE-Produktion wurde bereits durch die Vakzinierung mit pFascin- β Gal sehr stark inhibiert (um 88%). Die Koapplikation von IL-10-kodierenden Plasmiden konnte den inhibitorischen Effekt der pFascin- β Gal-Vakzinierung auf die IgE-Produktion nicht signifikant verstärken (pFascin- β Gal/pCMV-IL10: 88%, pFascin- β Gal/pFascin-IL-10: 95%).

Eine Woche nach Abschluss der Sensibilisierung wurden die Milzen sowie die drainierenden Lymphknoten präpariert. Milz- und Lymphknotenzellen wurden 72 Stunden mit und ohne die Zugabe von β Gal kultiviert und die Zytokinkonzentrationen in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt (Abb. 3.3.27).

Die Sensibilisierung durch wiederholte Immunisierung mit 1 μ g β Gal adsorbiert an Alum führte in den nicht vakzinierten Tieren zu einer starken Produktion des Th2-Zytokins IL-5 durch Milz- und Lymphknotenzellen nach Restimulation *in vitro*. Es wurde auch eine moderate IL-10-Produktion nachgewiesen. In den Milzzellkulturen unvakziniertter Mäuse wurde kaum IFN- γ nachgewiesen, es kam jedoch zu einer stärkeren IFN- γ -Produktion in den Lymphknotenzellkulturen.

In den Milz- und Lymphknotenzellkulturen von Mäusen, die mit pFascin- β Gal vakziniert worden waren, wurde nach Restimulation mit β Gal signifikant weniger IL-5 (20%) gebildet als in denen unvakziniertter Mäuse (Abb. 3.3.27 A, SC). Die IFN- γ -Produktion war verglichen mit der unvakzinierten Gruppe signifikant erhöht. Die IL-10-Produktion war in den Milzzellkulturen von Mäusen, die mit pFascin- β Gal vakziniert worden waren verglichen mit der IL-10-Konzentration in Milzzellkulturüberständen von der unvakzinierten Gruppe signifikant erhöht (Abb. 3.3.27 C, SC).

Die Koapplikation von pCMV-IL-10 führte zu einer reduzierten IL-5-Produktion durch restimulierte Milzzellen verglichen mit der Vakzinierung mit pFascin-βGal allein. Die IL-5-Produktion in dieser Gruppe war um ~20% verglichen mit der mit pFascin-βGal vakzinierten Gruppe und um ~40% verglichen mit der unvakzinierten Gruppe reduziert. Die Koapplikation von pFascin-IL-10 konnte den inhibitorischen Effekt der Vakzinierung mit pFascin-βGal allein nicht wesentlich verstärken.

In den Lymphknotenzellkulturen war jedoch nur in mit pFascin-βGal vakzinierten Gruppe eine Inhibition der IL-5-Produktion nachweisbar (Abb. 3.3.27 A, LNC). Die Lymphknotenzellen aus Mäusen, denen IL-10-kodierende Plasmide koappliziert worden waren, produzierten genau so viel IL-5 wie die Lymphknotenzellen aus nicht vakzinierten Mäusen.

In den Milzzellkulturen aller vakzinierter Gruppen war eine signifikant erhöhte IFN-γ-Produktion verglichen mit der unvakzinierten Gruppe zu verzeichnen (Abb. 3.3.27 B, SC). Die Koapplikation von IL-10-kodierenden Plasmiden führte zu einer signifikant geringeren IFN-γ-Produktion (pCMV-IL-10: ~54% weniger, pFascin-IL-10: ~68% weniger) verglichen mit der Vakzinierung mit pFascin-βGal allein.

In den Lymphknotenzellkulturen war nur nach Vakzinierung mit pFascin-βGal allein eine signifikante Erhöhung der IFN-γ-Produktion gegenüber den unvakzinierten Tieren nachweisbar (Abb. 3.3.27 B, LNC). Die Lymphknotenzellen aus Mäusen, denen IL-10-kodierende Plasmide koappliziert worden waren, produzierten genau so viel IFN-γ wie die Lymphknotenzellen aus nicht vakzinierten Mäusen. Diese Resultate zeigen, dass die durch pFascin-βGal induzierte Th1-Antwort durch die Koapplikation von IL-10-kodierenden Plasmiden abgeschwächt werden kann.

Die IL-10-Produktion war in den Milzzellkulturen der mit pFascin-βGal und pFascin-βGal/pCMV-IL-10 vakzinierten Gruppe gegenüber der unvakzinierten Gruppe signifikant erhöht (Abb. 3.3.27 C, SC). Besonders die Koapplikation von pCMV-IL-10 führte zu einer Steigerung der IL-10-Produktion durch restimulierte Milzzellen (~64% mehr als die unvakzinierte Gruppe und ~30% mehr als die mit pFascin-βGal vakzinierte Gruppe). Auch die Lymphknotenzellen aus dieser Gruppe produzierten am meisten IL-10 (Abb. 3.3.27 C, LNC). Sie produzierten ~75% mehr IL-10 als die Lymphknotenzellen der unvakzinierte Gruppe und ~79% mehr als die der mit pFascin-βGal vakzinierten Gruppe.

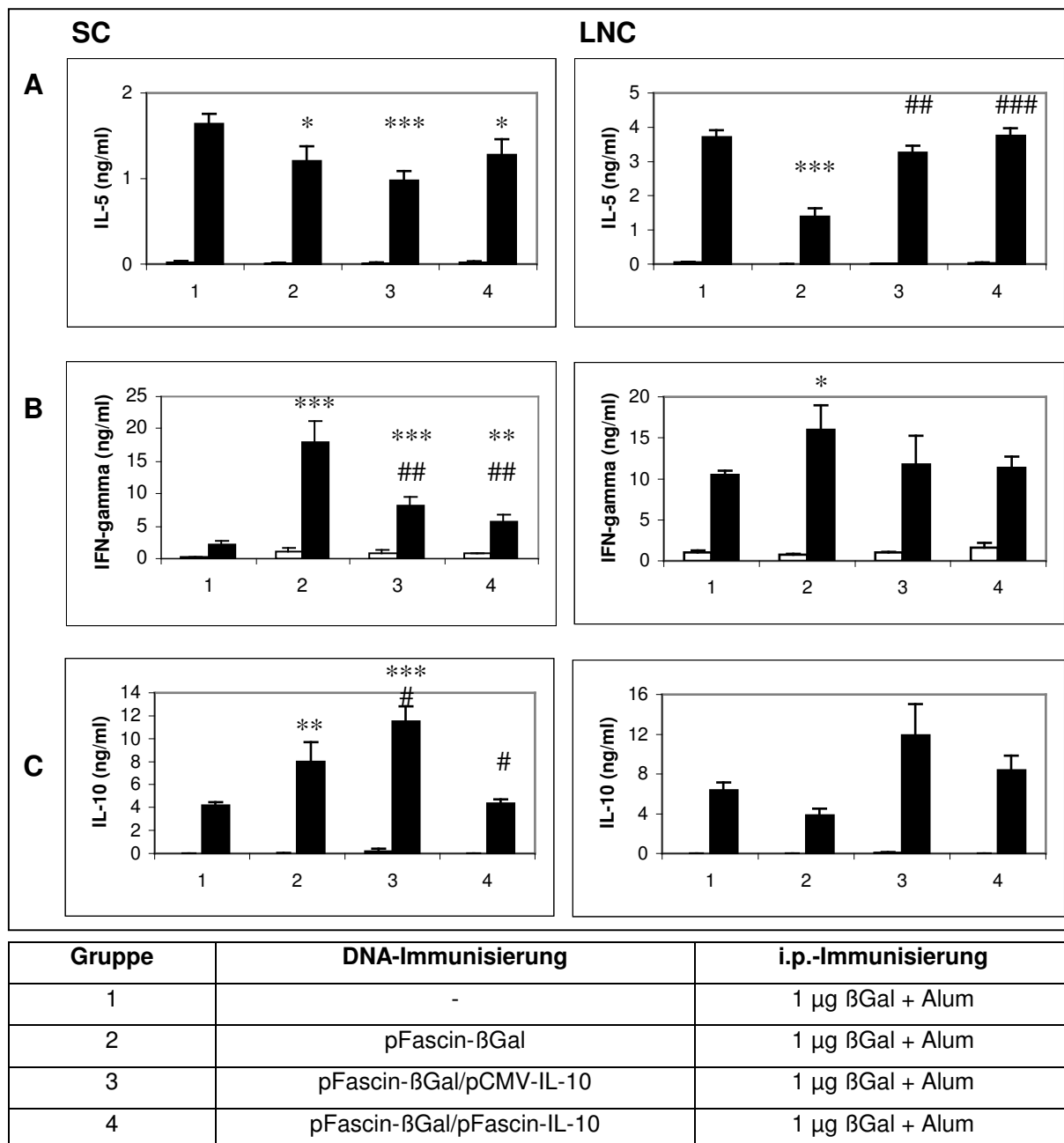


Abb. 3.3.27: Einfluss einer Koapplikation von IL-10-kodierenden Plasmiden auf die Zytokinproduktion von Milz- und Lymphknotenzellen nach Immunisierung mit pFascin-βGal im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I Allergie

BALB/cJ-Mäuse (n=4) wurden dreimal mit pFascin-βGal bzw. pFascin-βGal/pCMV-IL-10 oder pFascin-βGal/pFascin-IL-10 mittels Genpistole immunisiert. 14 Tage nach der letzten Vakzinierung wurden diese Mäuse sowie nicht vakzinierter Kontrolltiere durch wiederholte Immunisierung mit 1 µg βGal sensibilisiert. Eine Woche nach der fünften Immunisierung wurden die Milz- und Lymphknotenzellen isoliert und ohne (weiße Balken) und mit 25 µg/ml βGal (schwarze Balken) kultiviert. Die Mengen der Zytokine IL-5, IFN-γ und IL-10 in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD der Zytokinkonzentrationen in den Überständen aus je vier Kulturen. Signifikante Unterschiede in der Zytokinproduktion von den vakzinierter Gruppen verglichen mit der unvakzinierter Gruppe sind mit Sternen gekennzeichnet (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). Signifikante Unterschiede in der Zytokinproduktion von der mit pFascin-βGal vakzinierter Gruppe verglichen mit den mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 oder pFascin-βGal/pFascin-IL-10 vakzinierter Gruppen sind mit Rauten gekennzeichnet (# p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001).

Gemessen an der Zytokinproduktion restimulierter Milz- und Lymphknotenzellen konnte mit der Koapplikation von pCMV-IL-10 die stärkste Inhibition der Th2- und Th1-Zytokinproduktion und die stärkste IL-10-Induktion erreicht werden.

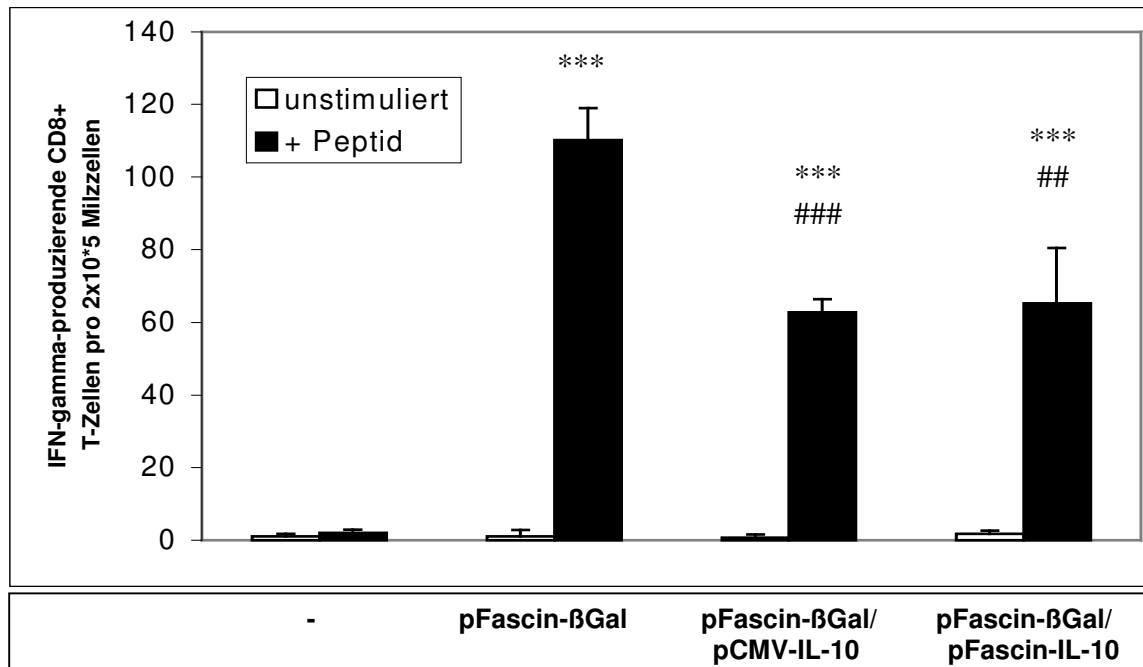


Abb. 3.3.28: Einfluss einer Koapplikation von IL-10-kodierenden Plasmiden auf die Induktion IFN- γ -produzierender zytotoxischer T-Zellen nach Immunisierung mit pFascin- β Gal im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I Allergie

BALB/cJ-Mäuse ($n=4$) wurden dreimal mit pFascin- β Gal bzw. pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 und pFascin- β Gal/pFascin-IL-10 mittels Genpistole immunisiert. 14 Tage nach der letzten DNA-Vakzinierung wurden diese Mäuse sowie nicht vakzinierter Kontrolltiere durch wiederholte Immunisierung mit 1 μ g β Gal sensibilisiert. Eine Woche nach der fünften Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und die Anzahl IFN- γ -produzierender CD8⁺ T-Zellen wurde mittels ELISpot ermittelt. Dazu wurde 2×10^5 Milzzellen auf ELISpot-Mikrotiterplatten, die mit anti-IFN- γ -Antikörpern beschichtet worden waren ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) β Gal-Peptid TPHPARIGL (1 μ g/ml) kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von Quadruplikaten. Signifikante Unterschiede in der CTL-Anzahl von unvakzinierter und vakzinierter Tiere sind durch Sterne gekennzeichnet (***) ($p < 0,001$). Signifikante Unterschiede in der CTL-Anzahl in der mit pFascin- β Gal vakzinierter Gruppe verglichen mit den mit pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 oder pFascin- β Gal/pFascin-IL-10 vakzinierter Gruppen sind mit Rauten gekennzeichnet (## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$).

Mit den Milzzellen wurden außerdem CTL-ELISpot-Analysen durchgeführt, um eine Induktion IFN- γ -produzierender zytotoxischer T-Zellen in den behandelten Tieren nachzuweisen (Abb. 3.3.28). In der unvakzinierter Gruppe waren keine IFN- γ -produzierenden zytotoxischen T-Zellen nachweisbar. Die Vakzinierung mit pFascin- β Gal führte zu einer starken CTL-Induktion (~ 110 CTL/ 2×10^5 Milzzellen). Auch nach Koapplikation von IL-10-kodierenden Plasmiden fand eine Induktion IFN- γ -produzierender zytotoxischer T-Zellen statt, die jedoch verglichen mit der

Vakzinierung mit pFascin-βGal allein signifikant geringer ausfiel. Die CTL-Induktion in der Gruppe, die mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 vakziniert worden war, war um ~43% reduziert, die Koapplikation von pFascin-IL-10 führte zu einer ~41% geringeren Induktion zytotoxischer T-Zellen gegenüber der mit pFascin-βGal vakzinierten Gruppe.

Insgesamt wurden die besten inhibitorischen Effekte auf die Antikörperproduktion, die Zytokinproduktion und die CTL-Induktion durch die Vakzinierung mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 erzielt. Die IgG1- und IgG2a-Induktion war nach der Immunisierung mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 signifikant geringer als nach Immunisierung mit pFascin-βGal allein oder in Kombination mit pFascin-IL-10. Bei der nachfolgenden Sensibilisierung mit βGal-Protein wurde die IgG1- und IgG2a-Produktion in dieser Gruppe langsamer gesteigert als in den anderen vakzinierten Gruppen, nach der fünften i.p. Immunisierung hatten sich die Antikörpertiter der verschiedenen vakzinierten Gruppen jedoch aneinander angeglichen. Milz- und Lymphknotenzellkulturen der mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 vakzinierten Gruppe produzierten verglichen mit den anderen vakzinierten Gruppen die geringsten Th1- und Th2-Zytokinmengen und in dieser Gruppe fand auch die geringste Induktion IFN-γ-produzierender CTL statt. Auch nach der Sensibilisierung mit βGal-Protein war die Anzahl IFN-γ-produzierender CTL in dieser Gruppe am kleinsten. Milz- und Lymphknotenzellkulturen der mit pFascin-βGal/pCMV-IL-10 immunisierten und protein-sensibilisierten Gruppe produzierten die geringsten IL-5- und IFN-γ-Mengen und am meisten IL-10 verglichen mit den anderen vakzinierten und sensibilisierten Gruppen. Es kam durch die Koapplikation von pCMV-IL-10 also zu einer Inhibition der Th2-Antwort und zu einer abgeschwächten Th1-Antwort. Daher wurde angenommen, dass sich eine Mischung aus pFascin-βGal und einem vom CMV-Promoter kontrollierten zytokinkodierenden Plasmid am besten als Kombinationsvakzine zur Inhibition von Immunantworten IgE-vermittelter Typ I Allergien eignet.

Im Folgenden wurden mit pFascin-βGal bzw. pFascin-βGal/pCI oder den Kombinationsvakzinen pFascin-βGal/pCMV-IL-10, pFascin-βGal/pCMV-TGFβ1 und pFascin-βGal/pCMV-IL-10/pCMV-TGFβ1 vakzinierte Mäuse dreimal im Abstand von je 14 Tagen mit 1 µg βGal adsorbiert an Alum immunisiert. Eine nicht vakzinierte Gruppe wurde ebenfalls mit βGal sensibilisiert. Eine Woche nach der dritten Protein-Immunisierung wurden die antigenspezifischen IgG1-, IgG2a- und IgE-Mengen in den Seren mittels ELISA bestimmt (siehe Abb. 3.3.29).

Die Sensibilisierung mit βGal-Protein führte in den nicht vakzinierten Mäusen zu einer starken Produktion von antigenspezifischen IgG1- und IgE-Antikörpern. Es wurde nur eine geringe IgG2a-Produktion induziert. Dieses Antikörperprofil ist typisch für eine Th2-polarisierte Immunantwort. Wie bereits dargestellt ist nach Vakzinierung mit pFascin-βGal die IgG1- und IgE-Produktion stark inhibiert. Stattdessen findet in mit pFascin-βGal vakzinierten Tieren eine starke IgG2a-Produktion statt. Alle vakzinierten Mäuse produzierten signifikant weniger IgG1 und signifikant größere Mengen IgG2a als die nicht vakzinierten Tiere. Auch die IgE-Produktion war in allen vakzinierten Tieren fast vollständig supprimiert (um 93 – 97%). Die Unterschiede zwischen den mit Kombinationsvakzinen immunisierten Gruppen und der mit pFascin-βGal immunisierten Gruppe waren nicht signifikant. Die stärkste Inhibition erfolgte durch Vakzinierung mit dem Konstrukt pFascin-βGal/pCMV-TGFβ1.

In Bezug auf die Effekte einer DNA-Vakzinierung auf die antigenspezifische Antikörperproduktion ist zusammenfassend festzustellen, dass die Koapplikation von IL-10-kodierenden Plasmiden und pFascin-βGal zwar zunächst eine geringere βGal-spezifische Antikörperproduktion in Mäusen induziert als die DNA-Immunisierung mit pFascin-βGal allein. Im Modell der IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion konnte die durch die Vakzinierung mit pFascin-βGal erreichte Inhibition der IgG1- und IgE-Produktion durch Koapplikation von IL-10-kodierenden Plasmiden jedoch nicht verstärkt werden.

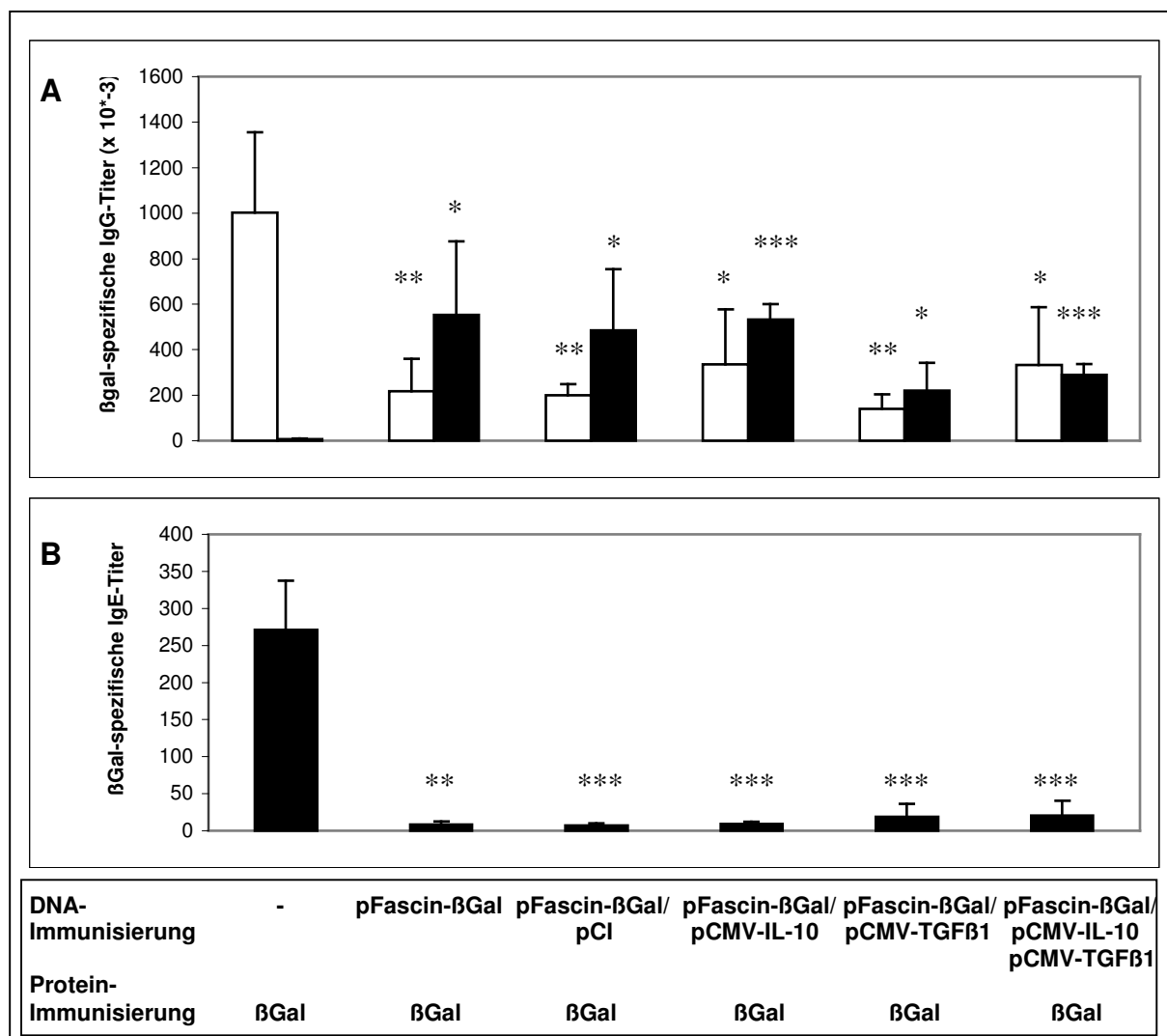


Abb. 3.3.29: Einfluss einer Kovakzinierung mit IL-10- und/oder TGFβ-kodierenden Plasmiden auf den Effekt der Vakzinierung mit pFascin-βGal im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I Allergie

BALB/cJ-Mäuse ($n=4$) wurden dreimal in Abstand von je 1 Woche mit pFascin-βGal bzw. pFascin-βGal/pCl oder mit den Kombinationsvakzinen pFascin-βGal/pCMV-IL-10, pFascin-βGal/pCMV-TGFβ1 und pFascin-βGal/pCMV-IL-10/pCMV-TGFβ1 mittels Genpistole vakziniert. Im Folgenden wurden die vakzinierten Mäuse und nicht vakzinierte Kontrolltiere dreimal im Abstand von je 14 Tagen i.p. mit 1 μg βGal adsorbiert an Alum immunisiert. Eine Woche nach der dritten Immunisierung wurden die Seren der Versuchsmäuse genommen und die Titer der βGal-spezifischen IgG1-, IgG2a- (A) und IgE- (B) Antikörper mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der βGal-spezifischen Antikörpertiter individueller Seren. Signifikante Unterschiede zwischen den vakzinierten und nicht vakzinierten Tieren sind mit Sternen gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Die Unterschiede zwischen den mit Kombinationsvakzinen immunisierten Gruppen und der mit pFascin-βGal/Kontrollplasmid immunisierten Gruppe waren nicht signifikant.

Diese Ergebnisse wurden in einem weiteren Experiment bestätigt, in dem BALB/c-Mäuse zunächst mit pFascin-βGal bzw. pFascin-βGal/pFascin-EGFP oder den Kombinationsvakzinen pFascin-βGal/pCMV-TGFβ1 und pFascin-βGal/pCMV-IL-10/pCMV-TGFβ1 vakziniert wurden. Im Anschluss wurden die vakzinierten Tiere sowie unvakzinierte Kontrolltiere zweimal mit 1 µg βGal-Protein adsorbiert an Alum sensibilisiert. Eine Woche nach der letzten Sensibilisierung wurde den Versuchsmäusen Blut abgenommen und die βGal-spezifischen IgG1-, IgG2a- und IgE-Titer in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt (Abb. 3.3.30). Verglichen mit den vorherigen Versuchen, in denen die Tiere mindestens drei Proteinimmunisierungen bekamen, waren die βGal-spezifischen IgG1-Titer in den unvakzinierten, zweimal sensibilisierten Mäusen niedriger. Doch auch nach 2 Protein-Immunsierungen konnte in der unvakzinierten Gruppe ein starker Anstieg der βGal-spezifischen IgG1- und IgE-Produktion nachgewiesen werden, während nur marginale IgG2a-Mengen produziert wurden. Im Gegensatz dazu war in allen vakzinierten Tieren eine starke IgG2a-Produktion messbar, die signifikant über der der unvakzinierten Tiere lag, während die βGal-spezifische IgE-Produktion fast vollständig supprimiert war. Weiterhin kam es zu einer leichten, zu diesem Zeitpunkt nicht signifikanten Inhibition der IgG1-Produktion durch die Vakzinierung mit pFascin-βGal oder pFascin-βGal/pFascin-EGFP. Die Koapplikation von TGFβ-kodierenden Plasmiden führte hingegen zu einer signifikanten Inhibition der IgG1-Produktion. Außerdem war die βGal-spezifische IgG2a-Produktion in den Tieren, die mit den Kombinationsvakzinen pFascin-βGal/pCMV-TGFβ1 oder pFascin-βGal/pCMV-IL-10/pCMV-TGFβ1 verglichen mit den Tieren, die mit pFascin-βGal allein vakziniert worden waren, signifikant vermindert. Die stärkste Inhibition der βGal-spezifischen Antikörperproduktion wurde durch die Vakzinierung mit pFascin-βGal/pCMV-TGFβ1 erzielt.

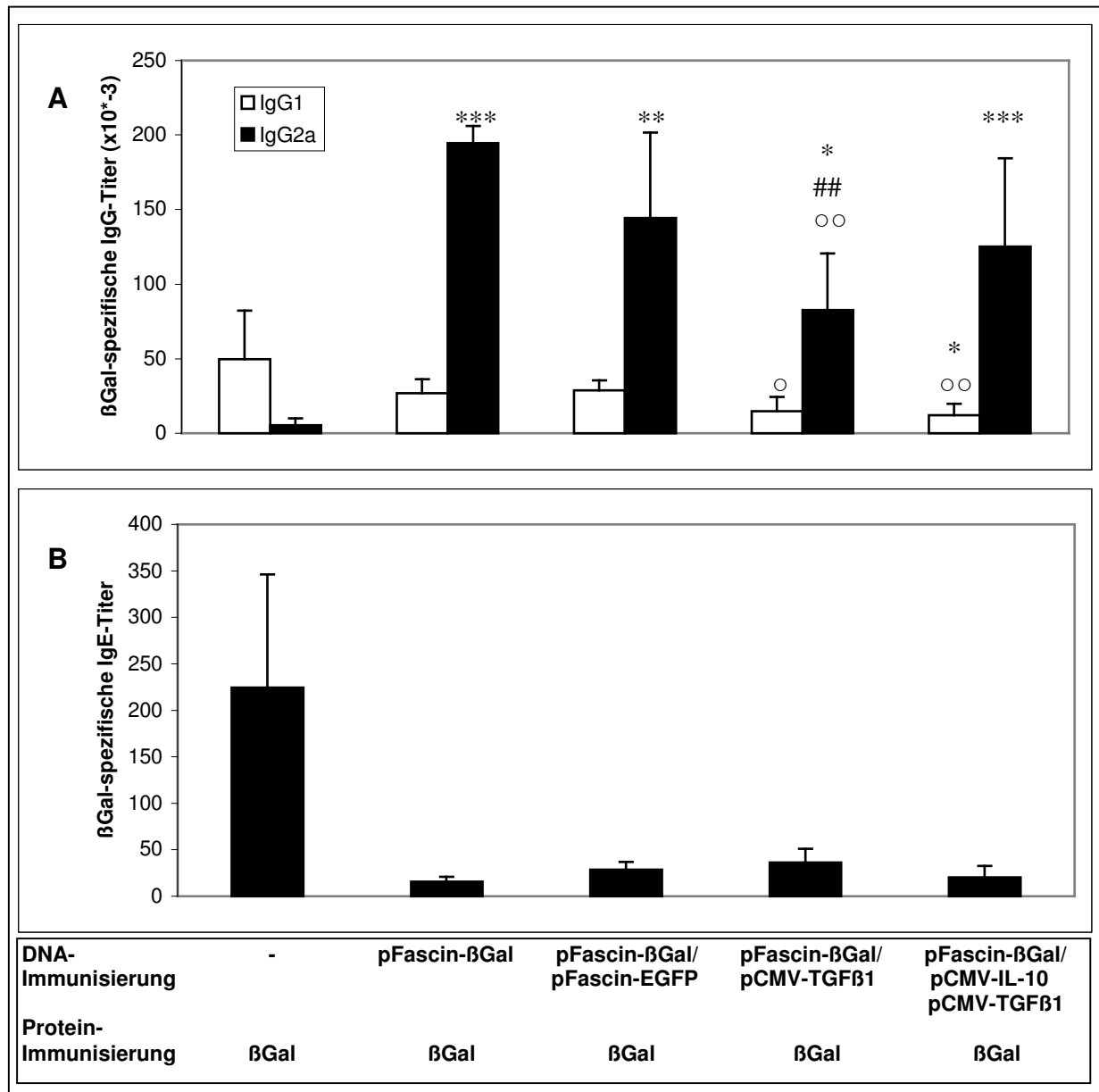


Abb. 3.3.30: Einfluss einer Kovakzinierung mit TGFβ-kodierenden Plasmiden auf den Effekt der Vakzinierung mit pFascin-βGal im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I Allergie

BALB/cJ-Mäuse (n=4) wurden dreimal im Abstand von je 1 Woche mit pFascin-βGal bzw. pFascin-βGal/pFascin-EGFP oder mit den Kombinationsvakzinen pFascin-βGal/pCMV-TGFβ1 und pFascin-βGal/pCMV-IL-10/pCMV-TGFβ1 mittels Genpistole vakziniert. Im Folgenden wurden die vakzinierten Mäuse und nicht vakzinierte Kontrolltiere zweimal im Abstand von je 14 Tagen i.p. mit 1 µg βGal adsorbiert an Alum immunisiert. Eine Woche nach der zweiten Immunisierung wurden die Seren der Versuchsmäuse genommen und die Titer der βGal-spezifischen IgG1-, IgG2a- (A) und IgE- (B) Antikörper mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD der βGal-spezifischen IgG-Titer individueller Seren. Signifikante Unterschiede zwischen den vakzinierten und nicht vakzinierten Tieren sind mit Sternen gekennzeichnet (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). Signifikante Unterschiede zwischen den mit Kombinationsvakzinen immunisierten Gruppen und der mit pFascin-βGal allein vakzinierten Gruppe sind mit Rauten (## p < 0,01), zwischen den mit Kombinationsvakzinen immunisierten Gruppen und der mit pFascin-βGal/pFascin-EGFP immunisierten Gruppe mit Kringeln (o p < 0,05, oo p < 0,01) gekennzeichnet.

Die Resultate aus den aufgeführten Untersuchungen zur Induktion von regulatorischen T-Zellen im Mausmodell der IgE-vermittelten Typ I Allergie durch

Vakzinierung mit IL-10- oder TGF β -kodierenden Plasmiden lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Nach dreimaliger Immunisierung mit pFascin- β Gal bzw. pFascin- β Gal/pCMV-IL-10, pFascin- β Gal/pCMV-TGF β 1 oder pFascin- β Gal/pCMV-IL-10/pCMV-TGF β 1 mittels Genpistole wurden signifikante inhibitorische Effekte einer Koapplikation von IL-10-kodierenden Plasmiden auf die IgG1- und IgG2a-Produktion nachgewiesen (siehe Abb. 3.3.24). Während die Koapplikation von TGF β -kodierenden Plasmiden keinen Einfluss auf die IgG1- und IgG2a-Produktion hatte, wurden durch die Immunisierung mit IL-10-kodierenden Kombinationsvakzinen signifikant geringere Antikörpermengen induziert als durch die Immunisierung mit pFascin- β Gal allein.

Darauf aufbauend wurde untersucht, ob die Koapplikation von IL-10- und/oder TGF β -kodierenden Plasmiden auch bei einer nachfolgenden Sensibilisierung mit β Gal-Protein einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die Antikörperproduktion hat als die Vakzinierung mit pFascin- β Gal allein. Alle β Gal-kodierenden DNA-Vakzine waren geeignet, die durch eine nachfolgende Sensibilisierung induzierte IgG1- und IgE-Antikörperproduktion zu inhibieren. Es war allerdings kein signifikanter Einfluss durch die Koapplikation von IL-10-kodierenden Plasmiden nachweisbar.

Daher kann man vermuten, dass die Kovakzinierung mit IL-10-kodierenden Plasmiden eine Immunsuppression bewirkt, die sich in einer reduzierten Antikörperproduktion, einer verminderten Sekretion von Th1- und Th2-Zytokinen und einer geringeren CTL-Induktion manifestiert. Dabei werden allerdings keine Treg induziert, die langanhaltend und bei anschließender Sensibilisierung aktiv sind.

Die Koapplikation von TGF β -kodierenden Plasmiden verbunden mit einer nachfolgenden Sensibilisierung führte hingegen zu einer leichten Inhibition der IgG1- und IgG2a-Produktion verglichen mit der Vakzinierung mit pFascin- β Gal allein. Diese Inhibition war in den in den Abbildungen 3.3.29 und 3.3.30 dargestellten Versuchen zu sehen, sie war jedoch nur im zweiten Versuch signifikant. Hierbei ist auffallend, dass nach dreimaliger DNA-Immunisierung kein inhibitorischer Effekt der Koapplikation von TGF β -kodierenden Plasmiden zu sehen war. Dieser wurde erst nach Sensibilisierung mit dem Protein beobachtet.

4. Diskussion

4.1 Aufklärung der Rolle regulatorischer T-Zellen im murinen Modell einer spezifischen Immuntherapie

Die Spezifische Immuntherapie (SIT) ist bisher die einzige kausale Behandlung von Allergien. Zur SIT werden den Patienten entweder Allergenextrakte oder rekombinante Allergene subkutan in ansteigenden Dosen verabreicht, bis eine Erhaltungsdosis erreicht ist. Akdis und Blaser formulierten 1999 die wichtigsten Wirkungsmechanismen der SIT: Die Induktion von antigenspezifischer T-Zell-Anergie und die Inhibition der antigenspezifischen Zytokinproduktion sowie der IgE-Produktion. Der Therapieerfolg manifestiert sich zunächst in der IL-10-Produktion durch antigenspezifische T-Zellen, im späteren Verlauf produzieren auch B-Zellen und Monozyten IL-10. Die anergen T-Zellen proliferieren nicht und die Zytokinproduktion ist supprimiert. IL-10 supprimiert die saisonale IgE-Produktion und steigert die IgG4-Bildung. Deshalb findet man nach einer SIT in den Patienten eine verminderte IgE:IgG4-Ratio [Akdis und Blaser 1999].

Während der Pollensaison steigt in Allergikern der prozentuale Anteil CD28⁺CD4⁺ T-Zellen, während der Anteil CTLA-4⁺CD4⁺ T-Zellen abnimmt. Die Bindung des kostimulatorischen Moleküls CD28 liefert ein positives Aktivierungssignal und induziert eine starke IL-2-Produktion in den T-Zellen. Im Gegensatz dazu führt die Bindung von CTLA-4 zu einer Inhibition der CD28-vermittelten Kostimulation [Coyle and Gutierrez-Ramos 2001]. Das bedeutet, dass während der Pollensaison mehr Effektorzellen zur Verfügung stehen, die nach der Erkennung der Allergens über CD28 aktiviert werden als T-Zellen, deren Aktivierung durch die Bindung von CTLA-4 inhibiert wird. Piconi et al. [2007] zeigten, dass die SIT dieser Regulation entgegen wirkt.

Außerdem ist die Frequenz CD80⁺ und CD86⁺ APC während der Pollensaison in unbehandelten Allergikern signifikant erhöht [Piconi et al. 2007]. Die Bindung des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf der APC an CD28 auf der T-Zelle hat eine bevorzugte Induktion von Th2-Antworten zur Folge [Tsuyuki et al. 1997, Keane-Myers et al. 1997]. Diese CD86⁺ APC können CD28⁺CD4⁺ T-Zellen aktivieren und allergenspezifische Th2-Antworten induzieren. In Zellkulturen aus SIT-behandelten Patienten finden sich hingegen vermehrt B7-H1⁺IL-10⁺ Monozyten

und B-Zellen [Piconi et al. 2007]. B7-H1 (auch PD-L1 oder CD274 genannt) ist konstitutiv auf maturen DC exprimiert und kann auf aktivierten Monozyten und aktivierten T-Zellen induziert werden [Coyle and Gutierrez-Ramos 2001, Piconi et al. 2007]. Die Ligation von B7-H1 auf APC hemmt die B-Zell-Expansion in den Keimzentren und die T-Zell-Proliferation. Es gibt widersprüchliche Daten dazu, ob die IL-10-Produktion durch B7-H1-Ligation gefördert oder gehemmt wird [Dong et al. 1999, Freeman et al. 2000, Coyle and Gutierrez-Ramos 2001]. IL-10, ursprünglich als Th2-Zytokin beschrieben, ist ein genereller Inhibitor der Proliferation und Zytokinproduktion von Th1- und Th2-Zellen *in vitro* und *in vivo* [Akdis und Blaser 1999, Fiorentino et al. 1991]. IL-10 wird von verschiedenen APC (Monozyten, Makrophagen, B-Zellen) sowie von Tr1-Zellen und NK-Zellen sezerniert [De Waal Malefyt et al. 1991, O'Garra et al. 1992, Vieira et al. 1991, Mosmann und Coffman 1989, Groux et al. 1997, Akdis und Blaser 1999].

Die Induktion von IL-10-produzierenden Zellen scheint ein Hauptmechanismus für eine erfolgreiche SIT zu sein. Akdis und Blaser [1999] schreiben, dass die IL-10-Produktion zunächst von Monozyten, B-Zellen und unspezifischen „Bystander-T-Zellen“ (CD4⁺CD25⁺ T-Zellen) ausgeht, welche dann Anergie in antigenspezifischen T-Zellen induzieren. Diese Anergie wird bei Neutralisation des IL-10 aufgehoben und die ursprüngliche Zytokinproduktion wird wieder hergestellt. Auch bestimmte Zytokine können die Anergie wieder brechen: IL-2 und IL-15 induzieren eine Th1-Zytokinproduktion und die Bildung von IgG4, während IL-4 die Produktion von Th2-Zytokinen und IgE reaktiviert [Akdis und Blaser 1999]. Dagegen zeigen Piconi et al. [2007], dass eine erfolgreichen SIT direkt mit der Induktion von IL-10-produzierenden CD4⁺CD25⁺ Treg einhergeht.

Da die Zahl allergischer Erkrankungen in der heutigen Zeit stark zunimmt, ist es ein wichtiges Forschungsziel, die Mechanismen der Entstehung von Allergien zu verstehen und innovative Strategien der Allergie-Prävention und -Therapie zu entwickeln und zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit die Effizienz verschiedener Therapiemodelle im Mausmodell der Typ I Allergie geprüft. Die Generierung von regulatorischen T-Zellen und die Charakterisierung der Rolle von Treg bei der Kontrolle von Typ I Allergien waren dabei von besonderem Interesse. Um verschiedene Möglichkeiten, Treg zum Zwecke der Therapie von Typ I Allergien zu generieren, zu evaluieren und um ein möglichst genaues Bild von

der Rolle dieser Treg bei der Kontrolle allergischer Immunantworten zu erstellen, wurden verschiedene Therapiemodelle im Maussystem untersucht. Die Effekte subkutaner Injektionen hoher Antigendosen zur Therapie der allergischen Immunantwort wurden im SIT-Modell nach Vissers et al. [2004] untersucht und die Effekte einer Sensibilisierung mit hohen oder niedrigen Antigendosen wurden in einem Modell der antigendosisabhängigen Regulation der IgE-Produktion, das von Prof. Dr. Kölsch in Münster etabliert worden war, analysiert.

In dem SIT-Mausmodell von Vissers et al. [2004] sensibilisierten die Autoren Mäuse mit dem Modellallergen OVA adsorbiert an Alum und injizierten den Tieren anschließend zur Therapie dreimal subkutan eine hohe OVA-Dosis von 1 mg. Diese Behandlung induzierte eine suppressive Immunantwort mit Langzeitgedächtnis. Auf die intranasale Provokation mit OVA reagierten behandelte Mäuse mit einer verminderten Produktion von antigenspezifischem IgE; die AHR und der Eosinophilen-Influx in die Lunge waren reduziert. Außerdem wurde anhand einer Messung der Zytokine in der BAL-Flüssigkeit belegt, dass lokal das Verhältnis der IL-10-Produktion zur IL-5-Produktion erhöht war. In den Lungen und thorakalen Lymphknoten von therapierten im Vergleich zu nicht therapierten Mäusen konnte jedoch kein erhöhter Anteil IL-10-exprimierender CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Vissers et al. spekulierten, dass durch die Allergen-Immuntherapie gleichzeitig die Th2-Antwort herunterreguliert wird und IL-10-produzierende CD4⁺ Suppressorzellen induziert werden. Da die Suppressorzellen in den therapierten Mäusen und die Th2-Effektorzellen in den nicht therapierten Tieren denselben Phänotyp (CD4⁺CD25⁺) haben und beide IL-10 produzieren, ließ sich diese Hypothese nicht beweisen. Weitere Experimente zeigten, dass die durch die subkutanen Injektionen der hohen OVA-Dosis induzierte Suppression der allergenspezifischen IgE-Produktion sowie der Th2-Zytokinproduktion und der AHR IL-10-vermittelt war. Diese Effekte der OVA-Behandlung konnten in anti-IL-10-behandelten Mäusen nicht erzielt werden. Die Induktion von IL-10-produzierenden Zellen scheint also essentiell für eine erfolgreiche Modulation der allergenspezifischen Immunantwort zu sein [Vissers et al. 2004].

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde in Anlehnung an die Experimente von Vissers et al. [2004] ein Immunisierungsprotokoll verwendet, das eine Sensibilisierungsphase, eine Therapiephase, fünf Wochen Ruhezeit und zuletzt eine intranasale Provokation beinhaltete. Im Unterschied zu den veröffentlichten Arbeiten

von Vissers et al., die lediglich die allergische Immunantwort in Mäusen verglichen hatten, die als Therapie OVA oder zur Kontrolle PBS verabreicht bekamen, wurden in den Versuchen der vorliegenden Arbeit zusätzliche Gruppen untersucht: in zwei weiteren Therapiegruppen wurden die Tiere subkutan (s.c.) bzw. intraperitoneal (i.p.) mit 1 mg OVA adsorbiert an Alum behandelt. Einer zusätzlichen Kontrollgruppe zur Überprüfung der Antigenspezifität der beobachteten Effekte wurde 1 mg des irrelevanten Antigens BSA s.c. injiziert. Zwei weitere Gruppen wurden nicht therapiert (Positivkontrolle, Negativkontrolle). Nach einer Ruhezeit von fünf Wochen wurden alle Gruppen bis auf die Negativkontrolle mit OVA intranasal provoziert. Den Tieren der Negativkontrolle, welche in den Experimenten von Vissers et al. nicht aufgeführt worden war, wurde intranasal PBS appliziert. Diese Kontrolle diente der Bewertung der Stärke der Induktion der Immunantwort in der Positivkontrolle und der Abschätzung der Effizienz der therapeutischen Effekte, die durch die OVA-Behandlung induziert wurden.

Die Ergebnisse belegen eine verminderte IgE-Produktion in allen therapierten Tieren mit Ausnahme der Mäuse, denen 1 mg OVA/Alum i.p. injiziert wurde. Da auch die Tiere der mit BSA behandelten Kontrollgruppe vergleichbar geringe IgE-Mengen produzierten (siehe 3.1.3), war dieser Effekt allerdings nicht antigenspezifisch. Die Zusammensetzung der Zellen in der BAL (siehe 3.1.5) wurde durch die subkutanen Injektionen von OVA allein oder adsorbiert an Alum und durch die Injektion des Kontrollantigens BSA nicht signifikant beeinflusst. Auch die AHR (siehe 3.1.4) wurde durch die verschiedenen Behandlungen nicht inhibiert. In den Tieren, denen 1 mg OVA adsorbiert an Alum i.p. injiziert worden war, kam es zu einer Steigerung der Atemwegsreaktivität. Gemessen an den Unterschieden im Zytokingehalt in den BAL-Flüssigkeiten führte die subkutane Injektion des Antigens OVA zu einem Therapieerfolg. Die lokale Inhibition der IL-5-Produktion einhergehend mit einer signifikanten Steigerung der IL-10-Produktion resultierte in einer signifikanten Verminderung der IL-5:IL-10-Ratio. Die Behandlung mit dem irrelevanten Kontrollantigen BSA führte zwar ebenfalls zu einer Inhibition der lokalen IL-5-Produktion, es kam jedoch nicht zu einem Anstieg der IL-10-Produktion in der Lunge. IFN- γ wurde in den BAL-Überständen nur in äußerst geringen Mengen nachgewiesen und spielt als Th1-Zytokin bei diesem Modell der SIT offenbar keine Rolle, auch wenn eine Verschiebung der allergenspezifischen Th2-Antwort in eine Th1-gerichtete Immunantwort in verschiedenen Veröffentlichungen als Merkmal einer

erfolgreichen SIT beim Menschen vorgestellt wird [Secrist et al. 1993, Jutel et al. 1995, Frew 2003, Lewis 2004, Till et al. 2004].

In den Kulturüberständen der thorakalen Lymphknotenzellen waren in allen Gruppen große Mengen der Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 messbar (siehe Abb. 3.1.7). In keiner der Therapiegruppen kam es zu einer signifikanten Inhibition der Produktion von Th2-Zytokinen im Vergleich zur Positivkontrolle. Wie in der BAL-Flüssigkeit konnte auch in den Überständen der Lymphknotenzellkulturen nur wenig IFN- γ nachgewiesen werden. Der Zytokingehalt in Kulturüberständen von restimulierten thorakalen Lymphknotenzellen wurde von Vissers et al. nicht analysiert. Daher ist es nicht möglich, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Vergleich mit Resultaten von Vissers et al. zu diskutieren. Wie in den Experimenten von Vissers et al. konnten auch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit eine Inhibition der IgE-Produktion und eine verminderte IL-5:IL-10-Ratio in der BAL-Flüssigkeit von mit 1 mg OVA s.c. therapierten Tieren nachgewiesen werden. Allerdings zeigen die Resultate aus den Experimenten der vorliegenden Arbeit, dass sich ähnliche therapeutische Effekte auch durch Injektion des irrelevanten Proteins BSA erzielen ließen, was bedeutet, dass die inhibitorischen Effekte auf die IgE-Produktion und die lokale IL-5-Produktion nicht antigenspezifisch waren. Da Vissers et al. diese zusätzliche Kontrollgruppe, die der Überprüfung der Antigenpezifität der Therapie-Effekte diene, nicht untersucht hatten, konnten sie keine Aussage über die Antigenpezifität ihrer Therapieerfolge treffen. Tatsächlich ließen sich im Rahmen der Experimente, die auf dem Mausmodell der SIT von Vissers et al. aufbauten, keine antigenspezifischen Therapie-Effekte nachweisen. Daher wurden die Versuche in diesem Modellsystem zunächst abgeschlossen.

Im Folgenden wurden Experimente zur Aufklärung der Rolle regulatorischer T-Zellen bei der Therapie von Typ I Allergien an einem weiteren Mausmodell der SIT, dem die antigen dosisabhängige Regulation der IgE-Produktion zugrunde lag, durchgeführt. Aus früheren Veröffentlichungen ist bekannt, dass die wiederholte Immunisierung von CBA-/J-Mäusen mit niedrigen Dosen PLA₂ oder KLH adsorbiert an Alum eine starke antigenspezifische IgE-Produktion auslöst, während die Immunisierung mit hohen Dosen dieser Antigene nur zu einer marginalen IgE-Induktion führt [Kolbe et al. 1991, 1994]. Im Gegensatz dazu steigt die IgG-Produktion jedoch mit zunehmender Antigen dosis. In der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion einer

antigendosisabhängigen Regulation der IgE-Produktion in BALB/c-Mäusen anhand der Antigene KLH und OVA sowie in C57Bl/6-Mäusen anhand des Antigens KLH nachgewiesen. Dabei war es wichtig, zu überprüfen, ob die IgE-Hypoproduktion in den hochdosig immunisierten Mäusen nicht durch eine Interferenz zwischen IgE- und IgG-Antikörpern vorgetäuscht wird. Da IgE insgesamt einen sehr kleinen Anteil der allergenspezifischen Immunglobulin-Produktion darstellt, könnte das Unvermögen, IgE in immunisierten Mäusen nachzuweisen, auch an einer Konkurrenzbindung durch andere, stärker vertretene Isotypen (z.B. IgM oder IgG) im antigenspezifischen Nachweistest des ELISA liegen. Tatsächlich wurden in früheren Studien geringe messbare IgE-Mengen schon mit Interferenzen durch antigenspezifisches IgG im Test erklärt [Gleich et al. 1991, Rihet et al. 1992]. Auch Kolbe et al. [1995] haben nachgewiesen, dass es unter bestimmten Bedingungen zu Interferenzen zwischen IgG und IgE kommen kann. Sie zeigten, dass die Immunisierung mit niedrigen Antigen Dosen IgE- und IgG-Antikörper induziert, die unterschiedliche Epitope erkennen, sodass es in diesem Fall nicht zu einer Konkurrenzbindung im Test kommen kann. Allerdings induziert die Immunisierung mit hohen Antigen Dosen nicht nur IgE- und IgG-Antikörper, die an verschiedene Epitope binden, sondern auch IgG-Antikörper, die das Epitop der IgE-Antikörper erkennen. In diesem Fall könnte es zu einer Interferenz zwischen IgG und IgE kommen, und so der IgE-Messwert verfälscht werden [Kolbe et al. 1995].

In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein alternativer Test durchgeführt, um die IgE-Hypoproduktion in den hochdosig immunisierten Mäusen nachzuweisen. In diesem, RBL-Test genannten, Detektionssystem zur Funktionalität von antigenspezifischem IgE macht man sich die Fähigkeit von IgE zunutze, an FcεRI auf der Oberfläche der RBL-2H3-Zellen zu binden und diese aufgrund der Quervernetzung der Rezeptoren nach Antigenzugabe zu aktivieren. Die Aktivierung führt zur Degranulation der RBL-2H3-Zellen und zur Freisetzung von Substanzen wie z.B. β-Hexosaminidase, die einfach nachgewiesen werden können und letztlich mit der IgE-Menge korrelieren. In diesem RBL-Test wurden Seren von hoch- und niedrigdosig immunisierten Mäusen untersucht. Unter 3.2.1 wird gezeigt, dass nur RBL-2H3-Zellen, die mit K01-Seren inkubiert und mit KLH stimuliert worden waren, signifikante Mengen β-Hexosaminidase ausschütteten, nicht aber RBL-2H3-Zellen, die mit K100-Seren inkubiert wurden. Der Test verifizierte, dass den Seren niedrigdosig immunisierter Mäuse, signifikant größere Mengen funktionell aktiven

antigenspezifischen IgEs vorhanden sind als in den Seren hochdosig immunisierter Mäuse.

Der RBL-Test bestätigte die Ergebnisse von Sudowe et al., die 1995 gezeigt haben, dass es sich bei den extrem geringen Mengen an messbarem IgE in den Seren hochdosig immunisierter Mäuse allerdings tatsächlich um eine IgE-Hypoproduktion handelt. Sudowe et al. [1995] schlossen die Möglichkeit eines Messfehlers bedingt durch konkurrierende Bindungen von anderen, in größeren Mengen vorhandenen Isotypen (IgG, IgM) an das plattengekoppelte Antigen bei der Etablierung des Systems in früheren Studien folgendermaßen aus: die Seren von hoch- und niedrigdosig immunisierten Mäusen wurden mit Protein G behandelt, wodurch die IgG-Antikörper aus den Seren depletiert wurden. Somit wurde eine mögliche Interferenz mit den im Vergleich zu den antigenspezifischen IgG-Antikörpern in geringen Konzentrationen vorkommenden IgE-Antikörpern im ELISA-Test verhindert. Nach Protein G-Behandlung waren die antigenspezifischen IgE-Mengen in den K01-Seren unverändert hoch, während in den K100-Seren immer noch kaum IgE nachweisbar war. Auch die Depletion von IgM beeinflusste den IgE-Nachweis nicht. Die geringen IgE-Messwerte in den K100-Seren beruhen also nicht auf einem Nachweisproblem, sondern es findet eine reelle Hypoproduktion von IgE in den hochdosig immunisierten Mäusen statt [Sudowe et al. 1995].

Kolbe et al. [1994] zeigten, dass die IgE-Titer in den Seren KLH-immunisierter Mäuse mit steigender Antigendosis sinken. Die IgG2a- und IgG1-Produktion verhält sich genau umgekehrt. Die Immunisierung mit PLA₂ führt ebenfalls zur dosisabhängigen IgE-Regulation, jedoch kann die Immunisierung mit PLA₂ dosisunabhängig keine Produktion von IgG2a- Antikörpern induzieren, während IgG1 wiederum mit steigenden Antigendosen verstärkt gebildet wird. Die inverse Regulation von IgE und IgG2a bei Verwendung von KLH als Antigen lässt eine Verschiebung der Immunantwort von einer Th2-Antwort in Richtung einer Th1-polarisierten Antwort vermuten. Bei Verwendung von PLA₂ als Antigen findet man jedoch die Inhibition der IgE-Produktion unabhängig von einer Induktion der IgG2a-Produktion. Diese Ergebnisse von Kolbe et al. [1994] legen nahe, dass ein Th1-Effekt eine ungenügende Erklärung für das Phänomen zu sein scheint.

Um zu untersuchen, ob in niedrigdosig immunisierten Mäusen eine Th2- und in hochdosig immunisierten Mäusen eine Th1-Antwort induziert wird, wurde in der vorliegenden Arbeit die antigenspezifische Zytokinproduktion in Kulturen von

Milzzellen aus hoch- und niedrigdosig immunisierten BALB/c-Mäusen untersucht. Milzzellen aus niedrigdosig immunisierten Mäusen produzierten nach Restimulation *in vitro* große Mengen Th2-Zytokine, aber keine Th1-Zytokine. Milzzellen von hochdosig immunisierten Mäusen produzierten hingegen deutlich geringere Mengen Th2-Zytokine, ohne dass es zu einer Induktion der Th1-Zytokinproduktion kam. Diese Ergebnisse bestätigen Resultate von Arps et al. [1998], die eine solche Regulation der Zytokinproduktion in Milzzellen aus hoch- und niedrigdosig immunisierten CBA/J-Mäusen beschrieben.

Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit IFN- γ - und IL-12p40-KO-Mäusen mit hohen und niedrigen KLH-Dosen immunisiert. Diese Mäuse sind defizient für die Th1-Zytokine IFN- γ bzw. IL-12. Da diese Zytokine für die Entwicklung von Th1-Zellen notwendig sind, können Mäuse, die einen Defekt in diesen Genen haben, keine funktionell aktiven Th1-Zellen bilden. Mit diesem Versuch wurde ein Th1-Effekt als Erklärung für die antigendosisabhängige Regulation der IgE-Produktion endgültig ausgeschlossen, da diese auch in den Th1-defizienten IFN- γ - und IL-12p40-KO-Mäusen nachgewiesen wurde (siehe 3.2.2).

Eine weitere Erklärung für die antigendosisabhängige Regulation der IgE-Produktion ist die Induktion von regulatorischen T-Zellen in den hochdosig immunisierten Mäusen, die die IgE-Produktion und die Produktion von Th2-Zytokinen supprimieren. Auch Arps et al. [1998] hatten bereits spekuliert, dass CD8⁺ regulatorische T-Zellen für die IgE-Suppression in hochdosig immunisierten Mäusen verantwortlich sein könnten. Hinweise auf die Existenz regulatorischer T-Zellen lieferten die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Proliferationsteste (siehe 3.2.4). Es wurden Zellkulturen mit verschiedenen Zelldichten angesetzt, da regulatorische T-Zellen ihre Nachbarzellen zum Teil über Zell-Zell-Kontakt supprimieren. Für diese Art der Suppression ist es notwendig, dass die Zellen in der Kultur nah beieinander sitzen, um in direkten Kontakt treten zu können. Bei einer Suppression mittels löslicher Faktoren können Treg und Zielzellen über größere Distanzen miteinander kommunizieren. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass Milzzellen aus K100-Mäusen nach Restimulation *in vitro* weniger proliferierten als Milzzellen aus K01-Mäusen und dass diese Hypoproliferation abhängig von der Zelldichte der Zellen in der Kultur war. Die Hypoproliferation in den K100-Milzzellkulturen implizierte das Vorhandensein von Treg, die möglicherweise ihre Nachbarzellen über Zell-Zell-Kontakt supprimieren.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Sakai et al. [1999], die antigendosisabhängige Immunantworten im murinen Asthmodell testeten. Sie sensibilisierten BALB/c-Mäuse an Tag 0, 7 und 14 mit 10, 100 und 1000 µg Ovalbumin (OVA) adsorbiert an Alum und provozierten die Tiere an den Tagen 15-20 mit OVA-Aerosol intranasal. Sie konnten in diesem System ebenfalls eine Antigendosisabhängigkeit der Immunantworten zeigen. Wie in den unter 3.2.1 der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen produzierten die Mäuse, die mit der niedrigsten OVA-Dosis immunisiert worden waren am meisten IgE, aber wenig IgG2a, während mit steigenden Antigendosen die IgE-Mengen im Blut abnahmen und die IgG2a-Produktion anstieg. Die antigenspezifische Proliferation und Zytokinproduktion der Milzzellen verhielt sich ebenfalls ähnlich wie in den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen (siehe 3.2.4 und 3.2.2). Milzzellen aus niedrigdosig immunisierten Tieren proliferierten stark und produzierten große Mengen an IL-5 und IL-4. Milzzellen aus hochdosig immunisierten Mäusen zeigten eine schwächere Proliferation und sezernierten nur wenig Th2-Zytokine. Sowohl Milzzellen aus niedrigdosig als auch aus hochdosig immunisierten Mäusen produzierten nur sehr geringe Mengen IFN- γ nach Restimulation *in vitro*. Sakai et al. untersuchten neben der systemischen Immunantwort (Serum, Milzzellen) auch die lokale Immunreaktion in der Lunge nach intranasaler Provokation. In der BAL von Mäusen, die mit 10 µg OVA/Alum immunisiert worden waren, wurden große Mengen an Zellen, vor allem eosinophile Granulozyten gefunden. Mit zunehmender Antigendosis nahm die Anzahl infiltrierender Zellen und der Anteil eosinophiler Granulozyten in der BAL ab. Diese Regulation korreliert mit dem Zytokinprofil der BAL-Flüssigkeit. IL-5 wurde nur in der Lungenflüssigkeit der niedrigdosig immunisierten Mäuse gefunden, während IFN- γ nur in der BALF hochdosig immunisierter Mäuse nachweisbar war. Lokal scheint die Immunisierung mit hohen OVA-Dosen also eine eher Th1-gerichtete Immunantwort zu induzieren, während systemisch Th1- und Th2-Zytokine supprimiert sind [Sakai et al. 1999].

Im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und den Vorarbeiten sowie auch entgegen den Erkenntnissen von Sakai et al. wurden von Morokata et al. [2000] Daten veröffentlicht, die in einem murinen Asthma-Modell generiert wurden, bei dem die Versuchstiere an Tag null und fünf mit unterschiedlichen OVA-Dosen adsorbiert an Alum intraperitoneal immunisiert wurden. Zwölf Tage nach dieser Sensibilisierung folgte eine intranasale Provokation mit OVA-Aerosol. Die

Sensibilisierung von C57BL/6-Mäusen mit $< 8 \mu\text{g}$ OVA führte zu einem mit Th2-Antworten assoziierten Antikörperprofil in den Seren mit viel IgG1 und IgE und wenig IgG2a. Nach der intranasalen Provokation war in den Lungen dieser Mäuse eine starke Produktion der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5, jedoch kaum IFN- γ nachweisbar. In BALB/c-Mäusen induzierte die niedrigdosierte Immunisierung ein mit Th1-Antworten assoziiertes Antikörperprofil mit viel IgG2a und wenig IgG1 und IgE in den Seren, sowie nach der intranasalen Provokation die Produktion von Th1-Zytokinen in der Lunge. Eine Sensibilisierung mit hohen Antigendosen ($> 50 \mu\text{g}$ OVA) führte hingegen in C57BL/6-Mäusen zu einer Th1-Antikörperantwort und der Sekretion von Th1-Zytokinen in der Lunge, während BALB/c-Mäuse Th2-Antikörper und lokal Th2-Zytokine produzierten. Der Eosinophilen-Influx in die Lunge war in niedrigdosiert immunisierten C57BL/6 größer als in BALB/c. Um eine starke Eosinophilie in BALB/c-Mäusen auszulösen, war eine Immunisierung mit 1 mg OVA nötig [Morokata et al. 2000].

Sakai et al. [1999] hingegen konnten in ihren Asthmastudien zeigen, dass in der BAL niedrigdosiert immunisierter BALB/c-Mäuse große Mengen an Zellen, vor allem eosinophile Granulozyten, zu finden waren. Mit zunehmender Antigendosis nahm die Anzahl infiltrierender Zellen und der Anteil eosinophiler Granulozyten in der BAL ab. Außerdem wurde das Th2-Zytokin IL-5 nur in der Lungengeflüssigkeit der niedrigdosiert immunisierten Mäuse gefunden, während das Th1-Zytokin IFN- γ nur im BALF hochdosiert immunisierter Mäuse nachweisbar war [Sakai et al. 1999]. Sakai et al. [1999] fanden also in der Lunge von BALB/c-Mäusen eine genau gegensätzliche antigendosisabhängige Th1-Th2-Regulation wie Morokata et al. [2000]. Bei der Bewertung der unterschiedlichen Resultate ist jedoch zu beachten, dass Morokata et al. [2000] ein anderes Immunisierungsprotokoll (Sensibilisierung an Tag 0 und 5, intranasale Provokation an Tag 12, Präparation an Tag 15) verwendet haben als Sakai et al. [1999] (Sensibilisierung an Tag 0, 7 und 14, intranasale Provokation an den Tagen 15-20, Präparation an Tag 21). Die unterschiedlichen Protokolle erschweren einen direkten Vergleich der Studien, da unklar ist, inwiefern dieser Faktor möglicherweise die Unterschiede in den Ergebnissen bedingen kann. Des Weiteren zeigten Morokata et al. [2000], dass in den Milzzellkulturüberständen von C57BL/6-Mäusen unabhängig von der Immunisierungsdosis (100 ng – 1 mg) immer Th1-Zytokine nachgewiesen wurden, die Milzzellen von BALB/c-Mäusen jedoch stets Th2-Zytokine sezernierten [Morokata et al. 2000]. Zwar konnten in der

vorliegenden Arbeit und von Sakai et al. [1999] auch ein stets Th2-gerichtetes Zytokinprofil in Milzzellkulturüberständen immunisierter BALB/c-Mäuse nachgewiesen werden, dieses wurde jedoch insofern antigendosisabhängig reguliert, als dass eine hochdosige Immunisierung im Vergleich zur niedrigdosigen Immunisierung zu einer generellen Inhibition der Th2-Zytokinproduktion durch Milzzellen führte. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Arps et al. [1998] in ihren Immunisierungsversuchen mit CBA/J-Mäusen. Bei der Bewertung dieser unterschiedlichen Ergebnisse muss jedoch wieder beachtet werden, dass die Studien zur antigendosisabhängigen Regulation der Immunantworten nach verschiedenen Immunisierungsprotokollen durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Proliferationskapazität von Milz- und Lymphknotenzellen, die aus K01- und K100-Mäusen isoliert wurden, deuten darauf hin, dass in den K100-Milzzellen eine regulatorische Zellpopulation enthalten ist, die benachbarte Zellen eventuell über einen zell-zell-kontaktabhängigen Suppressionsmechanismus inhibiert. Um zu untersuchen, ob die potenziell in den K100-Milzzellen enthaltenen regulatorischen T-Zellen die Proliferation von K01-Milzzellen in einer Kokultur supprimieren können, wurde die Proliferationskapazität von Kokulturen von K100- und K01-Milzzellen verglichen mit Einzelkulturen von K100- oder K01-Milzzellen analysiert. In diesen Kokulturen von K100- und K01-Milzzellen konnte allerdings keine Suppression der Proliferation der Zielzellen nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Proliferationskapazität von aktivierten K01-Milzzellen zu stark, um reguliert zu werden.

Außerdem wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, Zytokine und Transkriptionsfaktoren untersucht, die verstärkt von Treg exprimiert werden. Natürliche $CD4^+CD25^+$ Treg exprimieren auf ihrer Oberfläche konstitutiv CTLA-4 und GITR [Jonuleit et al. 2001, Sakaguchi 2004, Shimizu et al. 2002, Salomon und Bluestone 2001, Salto und Yamasaki 2003]. Die Expression dieser Kombinationen an Oberflächenmolekülen auf K100- und K01-Milzzellen wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht. Das wichtigste Molekül zur Identifikation natürlicher regulatorischer T-Zellen in der Maus ist der Transkriptionsfaktor Foxp3. Die Expression dieses intrazellulären Proteins wurde mittels Realtime-PCR in stimulierten Milzzellen und $CD4^+$ T-Zellen, die aus K01- und K100-Mäusen isoliert wurden, untersucht. Mittels Realtime-PCR wurde auch die

Expression der immunmodulatorischen Zytokine IL-10 und TGF β in diesen Zellen analysiert, die wichtige Merkmale für induzierte Treg (Tr1 und Th3) darstellen. Tr1 und Th3 agieren anders als die nTreg, welche einen zell-zell-kontaktabhängigen Suppressionsmechanismus nutzen, über IL-10- oder TGF- β -vermittelte Suppressormechanismen [Groux et al. 1997, Annacker et al. 2001, Satoguina et al. 2005, Zhao et al. 2006]. Tr1-Zellen wurden in Maus und Mensch nachgewiesen. Sie supprimieren ihre Zielzellen durch die Sekretion des immunregulatorischen Zytokins IL-10 [Gregori et al. 2007] und sind bei der Kontrolle verschiedener Autoimmunkrankheiten [Groux et al. 1997, Wildbaum et al. 2002] und bei der Transplantattoleranz [Bacchetta et al. 1994] von Bedeutung. Außerdem induzieren bestimmte Tumorarten und Krankheitserreger Tr1-Zellen, indem sie ein immunsuppressives Mikromilieu um sich schaffen und die Produktion von IL-10 fördern [Akasaki et al. 2004, Bergmann et al. 2007, Rouse und Suavas et al. 2007, Oderda et al. 2007]. Th3-Zellen üben durch die Sekretion von TGF β suppressive Effekte auf Th1-Zellen und andere Immunzellen aus. Th3-Zellen haben eine regulatorische Funktion bei der Kontrolle verschiedener Autoimmunkrankheiten [Chen et al. 1998, Seddon und Mason et al. 1999, Weiner 2001]. Außerdem können Th3-Zellen Allotransplantattoleranz induzieren [Josien et al. 1998] und die antigenspezifische „Hyporesponsiveness“ von Immunzellen bei einer chronischen Helmintheninfektion vermitteln [Doetze et al. 2000].

Keine dieser Expressionsanalysen auf Protein- oder mRNA-Ebene konnte jedoch signifikante Unterschiede zwischen K01- und K100-Zellen aufzeigen.

Ein weiterer Typ regulatorischer T-Zellen exprimiert CD8, aber nicht das kostimulatorische Molekül CD28 [Vukmanovic-Stejic et al. 2001]. Diese CD8⁺ Suppressor-T-Zellen supprimieren beispielweise die Antikörperantwort auf lösliche und zellassozierte Antigene und die Antwort gegen Superantigene [Vukmanovic-Stejic et al. 2001]. Auch die Suppression von Autoimmunerkrankungen und die Inhibition von Transplantationskomplikationen wie „graft-versus-host disease“ (GVHD) und von Transplantatabstoßung wird von CD8⁺ Suppressor-T-Zellen vermittelt [Vukmanovic-Stejic et al. 2001, Chitnis et al. 2001, Sun et al. 1988, Zhang et al. 1993, Douillard et al. 1996]. Für die Wirkweise der CD8⁺ Suppressor-T-Zellen kommen verschiedene Suppressionsmechanismen in Frage: die Inaktivierung von CD4⁺ T-Zellen mittels sezernierter immunregulatorischer Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF β oder Zell-Zell-Kontakt sowie das Ausschalten der

CD4⁺ T-Zellen durch direkte Lyse oder Apoptoseinduktion über Fas/Fas-Ligand oder Perforin sowie TNF- α [Vukmanovic-Stejic et al. 2001]. Auch eine indirekte Suppression der CD4⁺ T-Zellen durch eine Modifikation der APC ist möglich [Vukmanovic-Stejic et al. 2001].

Die Expression von CD8 auf Milzzellen ohne eine gleichzeitig Expression von CD28 wurde ebenfalls mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen K100- und K01-Milzzellen nachgewiesen.

$\gamma\delta$ -T-Zellen umfassen ca. 1,6 - 2,4% der Gesamt-T-Zellen [Harrison et al.1996] und wirken in vielen Bereichen wie der Inhibition von Autoimmunerkrankungen [Cardillo et al. 1993, Harrison et al.1996], der Transplantattoleranz [Gorczynski 1994] und der Suppression der Anti-Tumor-Antwort [Seo und Egawa 1995] immunregulatorisch. In einem murinen Allergiemodell vermittelten CD8⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen nach OVA-Inhalation die Suppression der IgE-Produktion und der T-Zellantwort [McMenamin et al. 1994]. Um zu untersuchen, ob dieser Typ regulatorischer T-Zellen an dem Effekt der antigendosisabhängigen IgE-Regulation beteiligt sein könnte, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der Expression des $\gamma\delta$ -TCR in Kombination mit CD4 und CD8 durchgeführt. Es wurde jedoch keine erhöhte Frequenz $\gamma\delta$ -TCR⁺ Zellen unter den K100-Milzzellen gefunden.

Keine der Expressionsanalysen für typische Treg-Marker konnte also signifikante Unterschiede zwischen K01- und K100-Zellen aufzeigen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass möglicherweise keine konventionellen regulatorischen T-Zellen an der antigendosisabhängigen IgE-Regulation beteiligt sind. Zur Identifikation dieser potenziellen Treg wurden daher Transferversuche durchgeführt (siehe 3.2.5). Während der Transfer von CD90⁺ T-Zellen aus K100-Mäusen die IgE-Produktion effizient inhibierte, konnten weder aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen noch CD8⁺ T-Zellen noch eine Kombination aus beiden Populationen die IgE-Suppression vermitteln. Um auszuschließen, dass es sich bei der regulatorischen Population um NKT-Zellen handeln könnte, die neben den konventionellen T-Zellen bei der Isolation CD90⁺ Zellen gewonnen wurde, wurden T-Zellen mittels einer alternativen Methode aufgereinigt. Die Methode der negativen T-Zell-Anreinigung beinhaltet einen Inkubationsschritt mit einem Depletionscocktail, der biotinylierte Antikörper gegen CD45R, DX5, CD11b und Ter-119 enthält, an welche in einem zweiten Schritt anti-Biotin-MicroBeads gebunden werden. Damit werden auch die DX5⁺ NKT-Zellen

depletiert. Die aufgereinigte Zellsuspension enthält $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen und $CD4^-CD8^-$ T-Zellen. Es stellte sich heraus, dass sowohl positiv als auch negativ aufgereinigte K100-T-Zellen die durch niedrige Dosen induzierte IgE-Produktion in den Rezipienten sehr effektiv supprimierten. NKT-Zellen konnten also als Hauptregulatoren der IgE-Suppression in hochdosig immunisierten Mäusen ausgeschlossen werden.

Eine weitere mögliche regulatorische Population stellten die $CD4^-CD8^-$ T-Zellen (dnTZ) dar. Diese Population wurde zunächst von Londei et al. [1989] beschrieben. Zhang et al. veröffentlichten 2000 und 2006 interessante Experimente, die die regulatorische Funktion der dnTZ in verschiedenen Transplantationsmodellen darstellten. In einem Xeno-Transplantationsmodell mit Herztransplantaten aus Lewis-Ratten-Donoren für C57BL/6-Maus-Rezipienten konnten Zhang et al. [2006] zeigen, dass eine Kombination aus Immunsuppressiva und aktivierten dnTZ die Transplantatazeptanz signifikant verlängerte. Dies ging mit einer starken Inhibition der gegen den Donor gerichteten IgM- und IgG-Antikörper einher. Die Immunantwort gegen Xeno-Hauttransplantate konnte hingegen nicht durch den Transfer von aktivierten dnTZ inhibiert werden. Diese Versuche zeigten, dass dnTZ eine humorale B-Zell-Antwort effizient supprimieren, zelluläre Immunantworten jedoch nur unvollständig inhibieren können. Die Suppression durch dnTZ erfolgte über eine perforin- und granzymabhängige Lyse der Zielzellen (B-Zellen und T-Zellen) [Zhang et al. 2006]. In den letzten unter 3.2.5 beschriebenen Transferexperimenten wurden die aus Milzzellen von K100-Mäusen aufgereinigten dnTZ bzw. die depletierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in naive Rezipienten transferiert. Nach repetitiver Immunisierung der Rezipienten mit der niedrigen Antigendosis wurden die Mengen der antigenspezifischen IgE-Antikörper in den Seren nachgewiesen. Nur in den Tieren, denen dnTZ aus K100-Mäusen transferiert worden waren, war die IgE-Produktion fast vollständig supprimiert. Im Gegensatz dazu produzierten Mäuse, die einen Transfer der in derselben Präparation depletierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen bekommen hatten, große Mengen antigenspezifischer IgE-Antikörper. Mit diesen Transferversuchen wurden dnTZ aus hochdosig immunisierten Mäusen im System der antigendosisabhängigen IgE-Regulation als effiziente Überträgerpopulation für den suppressiven Effekt identifiziert. DnTZ scheinen also die regulatorischen T-Zellen zu sein, die das Phänomen der antigendosisabhängigen Regulation der IgE-Produktion in Mäusen vermitteln.

Einer der ersten Transferversuche hatte gezeigt, dass auch K100-B-Zellen den suppressiven Effekt auf die IgE-Produktion übertragen können. Da der inhibitorische Effekt der B-Zellen auch durch Konkurrenz bestehender antikörperproduzierender Plasmazellen mit neu aktivierten B-Zellen um das Antigen zustande kommen könnte und nicht zwangsläufig auf das Vorhandensein regulatorischer B-Zellen schließen lässt, wurden in den folgenden Versuchen zunächst die T-Zellen näher untersucht. Es gibt jedoch auch verschiedene immunologische Systeme, in denen B-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften eine Rolle spielen.

Ca. 75% der frühen unreifen B-Zellen sind selbstreaktiv und einige davon entkommen den zentralen Toleranzmechanismen „receptor editing“ oder Apoptoseinduktion. Sie wandern in die Peripherie aus und werden dort anergisiert. Anergie B-Zellen unterscheiden sich von naiven B-Zellen durch bestimmte Eigenschaften, die die Gefahr einer Teilnahme von selbstreaktiven B-Zellen an immunologischen Vorgängen limitieren: eine verkürzte Lebensdauer, veränderte Migration und Lokalisation im Organismus, Signaltransduktionsdefekte, den Ausreifungsstopp vor der Entwicklung zu Plasmazellen und die Unfähigkeit, aktiv mit T-Zellen zu interagieren [Cambier et al. 2007].

Neben B-Zellen, die durch die Produktion von Autoantikörpern an der Pathogenese von Autoimmunerkrankheiten teilnehmen können, gibt es zahlreiche Beispiele für B-Zellen mit regulatorischer Funktion, welche das Fortschreiten einer Entzündungsreaktion supprimieren. Diese regulatorischen B-Zellen (Breg) üben ihre inhibitorische Funktion über verschiedene Mechanismen aus, welche die Produktion von IL-10 und TGF β , sekundäre Antigenpräsentation sowie die Interaktion mit anderen Immunzellen involvieren. Dabei unterscheidet man B-Zellen, die eine Inflammation inhibieren und solche, die Toleranz induzieren [Mizoguchi und Bhan 2006].

Am bekanntesten sind IL-10-produzierende Breg, die in Maus und Mensch nachgewiesen wurden. Murine IL-10-produzierende B-Zellen spielen bei der Kontrolle von IBD („inflammatory bowel disease“), EAE, Arthritis und Lupus erythematosus eine Rolle [Mizoguchi und Bhan 2006].

Tsitoura et al. zeigten 2002, dass B-Zellen die T-Zell-Reaktionen auf allergische Stimuli in der Lunge beschränken können [Tsitoura et al. 2002].

Ob der suppressive Effekt der K100-B-Zellen auf die IgE-Produktion in der vorliegenden Arbeit auf regulatorische Aktivitäten der B-Zellen zurückzuführen ist, muss in weiteren Untersuchungen gelöst werden.

4.2 Induktion von regulatorischen T-Zellen mittels DNA-Vakzinierung zur Modulation allergenspezifischer Immunantworten

Die Desensibilisierung gegen Allergien wird gemeinhin durch zahlreiche subkutane Injektionen des Allergens in aufsteigenden Dosen bewerkstelligt. Um einen effizienten und lang anhaltenden Therapieerfolg zu erreichen, muss der Desensibilisierungsvorgang mindestens in drei aufeinander folgenden Jahren durchgeführt werden [Durham et al. 1999]. Desensibilisierungen schlagen häufig deshalb fehl, weil die Patienten die Therapie vorzeitig abbrechen [Donahue et al. 1999]. Außerdem hält die Angst vor Spritzen viele Patienten davon ab, sich regelmäßig impfen zu lassen oder eine medikamentöse Therapie in Anspruch zu nehmen, die injiziert werden muss [Nir et al. 2003]. Die Etablierung einer nadelfreien Therapiemöglichkeit, die schnell einen lang anhaltenden Therapieerfolg zeigt, ist daher wünschenswert. Die DNA-Immunisierung mit der Genpistole stellt solch eine Möglichkeit dar. Mit der Genpistole werden Zellen in der Haut transfiziert [Chen et al. 2002]. Früher wurde angenommen, dass die immunologisch wichtigen Zellen in der Haut die Langerhanszellen seien, welche nach Aktivierung (in diesem Fall durch erfolgreiche Transfektion) in die peripheren lymphoiden Gewebe auswanderten und dort naive T-Zellen aktivierten [Banchereau and Steinman 1998]. Neuere Erkenntnisse implizieren jedoch, dass Langerhanszellen in der Haut eine eher untergeordnete Rolle bei der Induktion von Immunantworten mittels biolistischer Transfektion spielen [Bennet und Clausen 2007, Stoecklinger et al. 2007]. Auch anhand des Mausmodells der Kontakthypersensitivität (CHS) wird zur Zeit kontrovers diskutiert, ob Langerhanszellen oder dermale DC die Zellen sind, die Antigene in der Haut aufnehmen, präsentieren und die entsprechenden Immunantworten auslösen [Bennet et al. 2005, Kissenpfennig et al. 2005, Bennet und Clausen 2007].

Bisher zeigte die DNA-Immunisierung mit der Genpistole als Form der Allergietherapie jedoch nur Teilerfolge.

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

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

In den Versuchen von Toda et al. [2000] und Scheiblhofer et al. [2006] konnten also mit der DNA-Immunisierung mit der Genpistole keine immunmodulatorischen Effekte erzielt werden, die einer allergischen Immunantwort entgegen wirkten. Es gibt jedoch andere Studien, die belegen, dass eine prophylaktische Applikation von allergenkodierenden Plasmiden die durch eine nachfolgende Sensibilisierung induzierte IgE-Produktion inhibieren kann.

Ludwig-Portugall et al. [2004] inhibierten in Maus-Sensibilisierungsmodellen effektiv die IgE-Produktion durch präventive DNA-Vakzinierung mit dem Modellallergen β Gal [Ludwig-Portugall et al. 2004]. Der therapeutische Einsatz einer solchen DNA-Immunsierung konnte jedoch einen bestehenden IgE-Titer im Serum sensibilisierter Mäuse nicht senken, sondern lediglich eine weitere Steigerung der IgE-Produktion verhindern. Außerdem war der Effekt nur transient [Sudowe et al. 2006].

Kendall et al. [2006] verwendeten in ihrem Mausmodell zur Therapie von allergischem Asthma eine Protein-Pistole, um OVA biolistisch zu applizieren. Diese Therapie konnte die IgE-Produktion in bereits sensibilisierten Mäusen senken. Auch die Lungeneosinophilie war in den therapierten Tieren um 40% reduziert. Die AHR konnte jedoch nicht inhibiert werden und die Mäuse reagierten sogar besonders stark auf den Methacholinreiz [Kendall et al. 2006].

Zindler et al. [2007] konnten durch DNA-Vakzinierung mit pFascin- β Gal im murinen Modell der allergischen Atemwegsentszündung zwar die Lungeneosinophilie in sensibilisierten und mit β Gal provozierten Tieren inhibieren, im Gegenzug kam es jedoch zu einer starken Neutrophilie. Außerdem reagierten mit DNA immunisierte Mäuse im Test der Atemwegsreaktivität stark auf die Provokation mit Methacholin [Zindler et al. 2007]. Die DNA-Vakzinierung mit pFascin- β Gal führte zwar zu einer Inhibition der systemischen und lokalen Th2-Immunantwort, die im Gegenzug auftretenden immunologischen Veränderungen, wie die Induktion von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, Th1-Effektorzellen und der Neutrophileninflux in die Lunge trugen jedoch zu lokalen immunpathologischen Effekten wie einer starken AHR bei.

Deshalb wurde an Ideen gearbeitet, das etablierte DNA-Vakzinierungssystem so zu modifizieren, dass sowohl Th2- als auch Th1-Immunantworten auf das Modellallergen inhibiert werden. Eine Möglichkeit zur vollständigen Inhibition der Immunantworten auf das Modellallergen besteht in der Induktion von regulatorischen T-Zellen durch eine gesteigerte Produktion von IL-10 oder TGF β . Ein ähnlicher Ansatz wurde im Laufe der Arbeit bei der EAE-Therapie erfolgreich verfolgt.

Da gezeigt wurde, dass IL-10-produzierende Tr1-Zellen bei der Regulation der EAE eine wichtige Rolle spielen [Wildbaum et al. 2002], wurde in einem Therapieansatz die Möglichkeit untersucht, mit einer kombinierten DNA-Vakzine aus MBP- und IL-10-kodierenden Plasmiden antigenspezifische Tr1-Zellen schnell zu induzieren

und ihre regulatorische Funktion zu steigern. Die Behandlung der gerade erkrankten Ratten mit den therapeutischen Plasmiden führte zu einer schnellen Suppression der EAE. Dieser Effekt war krankheitsspezifisch und IL-10-abhängig. Die EAE-Toleranz war durch MBP-spezifische T-Zellen aus protektierten Donoren übertragbar. Durch die Applikation des MBP- und IL-10-kodierenden Plasmids wurde also das natürliche Auftreten antigenspezifischer Tr1-Zellen beschleunigt, so dass es zu einer schnelleren Heilung kam. Da dies ein direkter Effekt der regulatorischen Zellen war, konnte die Toleranz übertragen werden [Schif-Zuck et al. 2006].

Ziel der Versuche der vorliegenden Arbeit war es, in DC eine gleichzeitige Expression des Modellallergens β Gal und der immunmodulatorischen Zytokine IL-10 oder TGF β zu induzieren und so eine tolerogene β Gal-spezifische Immunantwort auszulösen. Dazu wurden die Expressionsplasmide pFascin- β Gal und pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF β zusammen auf ein gemeinsames Goldkugelchen adsorbiert. So entstand eine Kombinationsvakzine, die gewährleistet, dass transfizierte Zellen immer sowohl das allergenkodierende Plasmid pFascin- β Gal als auch das Plasmid, das das immunregulatorische Zytokin kodierte (pCMV-IL-10 oder pCMV-TGF β) erhielten. Des Weiteren wurde der Fascin-Promoter für die Kontrolle des β Gal-Gens gewählt, um zu gewährleisten, dass nur direkt transfizierte DC die Immunantwort auf das Modellallergen β Gal induzieren können. Diese Beschränkung auf direkt transfizierte DC sowie die Kopplung der Plasmide auf einem gemeinsamen Goldpartikel stellt sicher, dass die DC, die die β Gal-spezifische Immunantwort auslösen, gleichzeitig das immunmodulatorische Zytokin IL-10 bzw. TGF β exprimieren. Die Immunisierung mit β Gal unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promoters hätte zur Folge, dass die Immunantwort nicht nur durch direkt transfizierte DC induziert werden würde, sondern auch durch Kreuzpräsentation über transfizierte Keratinozyten. DC, die nicht direkt transfiziert sind, sondern β Gal kreuzpräsentieren, exprimieren jedoch nicht die immunmodulatorischen Zytokine IL-10 oder TGF β und würden daher Effektorzellen aktivieren. Diese gleichzeitige Expression von β Gal sowie IL-10 oder TGF β ist daher notwendig, um die Induktion einer tolerogenen antigenspezifischen Immunantwort zu ermöglichen.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit gibt es Hinweise darauf, dass die Kombinationsvakzine aus einem β Gal- und einem IL-10-kodierenden Plasmid die β Gal-spezifische Immunantwort inhibieren und zu einer Verbesserung der Therapie gegenüber der Vakzinierung mit dem allergenkodierenden Plasmid allein führen kann

(siehe 3.3.3). Die ersten Vakzinierungsexperimente mit pFascin- β Gal im Vergleich mit den weiterentwickelten Konstrukten pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 und pFascin- β Gal/pFascin-IL-10 deuteten auf inhibierende Effekte der Kombinationsvakzine pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 auf die Antikörperproduktion, die Zytokinproduktion durch Milz- und Lymphknotenzellen sowie die CTL-Induktion hin. Dabei fiel im Hinblick auf die mögliche Entstehung regulatorischer T-Zellen eine erhöhte IL-10-Produktion in den Milz- und Lymphknotenzellkulturen der mit pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 immunisierten Gruppe ins Auge. Beim Vergleich der Effekte der verschiedenen Kombinationsvakzine pFascin- β Gal/pCMV-IL-10, pFascin- β Gal/pCMV-TGF β und pFascin- β Gal/pCMV-IL-10/pCMV-TGF β auf die IgG1- und IgG2a-Produktion nach dreimaliger Immunisierung mit der Genpistole zeigte sich, dass die Immunisierung mit IL-10-kodierenden Kombinationsvakzinen signifikant geringere Antikörpermengen induzierte als die Immunisierung mit pFascin- β Gal allein. Die Koapplikation von TGF β hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Antikörperproduktion und es kam nicht zu einem additiven Effekt von IL-10 und TGF β .

Bei der nachfolgenden Sensibilisierung wurde die Induktion der IgG1- und IgE-Antikörperproduktion in allen mit β Gal-kodierenden Plasmiden vakzinierten Mäusen verglichen mit den nicht vakzinierten Tieren inhibiert. Interessanterweise führte die Koapplikation von pCMV-TGF β 1 zu einer Inhibition der IgG1- und IgG2a-Produktion verglichen mit den Mäusen, die mit pFascin- β Gal allein vakziniert worden waren. Es ist unklar, warum dieser inhibitorische Effekt auf die Antikörperproduktion nicht unmittelbar nach der DNA-Immunisierung nachweisbar ist, sondern erst bei nachfolgender Sensibilisierung sichtbar wird. Eine Untersuchung der Effekte der Koapplikation von pCMV-TGF β 1 auf die Zytokinproduktion und die CTL-Induktion ist daher ein wichtiges Ziel weiterführender Experimente. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die inhibitorische Wirkung der Koapplikation von pCMV-TGF β 1 Auswirkungen auf die immunpathologischen Effekte hat, die durch eine lokale Provokation im Modell der allergischen Atemwegshyperreaktivität entstehen. Auf die Untersuchung der Effizienz einer Vakzinierung mit pFascin- β Gal/pCMV-TGF β 1 im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung (AHR, Zusammensetzung der Zellen in der BAL, Zytokine in der BALF, CTL in der Lunge) sollte daher in weiterführenden Studien ebenfalls ein Augenmerk gelegt werden .

Obwohl die Immunisierung mit IL-10-kodierenden Kombinationsvakzinen nach dreimaliger Immunisierung mittels Genpistole verglichen mit der Immunisierung mit pFascin- β Gal allein zu einer Inhibition der Antikörperproduktion führte, war nach der Sensibilisierung kein signifikanter Einfluss der Koapplikation von IL-10-kodierenden Plasmiden auf die durch die Vakzinierung mit pFascin- β Gal erzielte Inhibition der IgG1- und IgE-Antikörperproduktion nachweisbar.

Diese Ergebnisse implizieren, dass die Kovakzinierung mit IL-10-kodierenden Plasmiden eine Immunsuppression bewirkt, die sich in einer reduzierten Antikörperproduktion, einer verminderten Sekretion von Th1- und Th2-Zytokinen und einer geringeren CTL-Induktion manifestiert. Da nach der Sensibilisierung keine signifikanten Unterschiede in der Antikörperproduktion von Mäusen, die mit pFascin- β Gal allein bzw. mit den IL-10-kodierenden Kombinationsvakzinen immunisiert worden waren, zu sehen sind, kann man vermuten, dass keine Treg induziert werden die langanhaltend aktiv sind. Jedoch hatte die Koapplikation von pCMV-IL-10 länger anhaltende Effekte auf die Zytokinproduktion und die Induktion von CTL, die über die Sensibilisierung hinaus reichten. Die IL-5- und IFN- γ -Produktion durch Milzzellen aus mit pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 vakzinierten Tieren war stärker inhibiert als aus mit pFascin- β Gal allein vakzinierten Tieren. Gleichzeitig war die IL-10-Produktion in Milzzellkulturen von mit pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 vakzinierten Mäusen signifikant erhöht. In diesen Tieren kam es außerdem zu einer geringeren Induktion von CTL.

Möglicherweise lässt sich mit der Kombinationsvakzine pFascin- β Gal/pCMV-IL-10 durch die Inhibition der Produktion von Th1- und Th2-Zytokinen, sowie die verminderte Induktion von zytotoxischen T-Zellen tatsächlich eine Immunsuppression bewirken, die auch bei einer lokalen Provokation zu einer Inhibition der immunpathologischen Effekte führt, die durch die Vakzinierung mit pFascin- β Gal allein hervorgerufen werden. Dies muss jedoch in folgenden Studien noch eingehender untersucht werden. Dazu muss die Auswirkung der Vakzinierung mit Kombinationsvakzinen im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung untersucht werden (AHR, Zusammensetzung der Zellen in der BAL, Zytokine in der BALF, CTL in der Lunge).

Der Therapieansatz, eine antigenspezifische Induktion von Tr1-Zellen durch die kombinierte Applikation von Antigen- und IL-10-kodierenden Plasmiden zu erzielen, scheint allerdings im EAE-Modell bisher erfolgreicher zu sein als im Allergiemodell.

Möglicherweise liegt das daran, dass die EAE im Gegensatz zur Typ I Allergie, eine Th1-vermittelte Krankheit ist. Tr1-Zellen wirken stark auf Th1-Zellen und sind daher erfolgreiche Regulatoren vieler Th1-vermittelter Autoimmunkrankheiten wie EAE, Kolitis und IBD [Wildbaum et al. 2002, Schiff-Zuck et al. 2006, Akdis und Blaser 1999, Groux et al. 1997, Neuman 2007]. Es gibt zwar auch Hinweise darauf, dass Tr1-Zellen möglicherweise durch die Induktion von CD8⁺ T-Zellen IgE-vermittelte allergische Reaktionen hemmen können [Kemeny und Diaz-Sanchez 1991], da IL-10 jedoch auch von Th2-Zellen produziert wird und die Th2-Polarisierung fördert, wird die Rolle dieses Zytokins in Th2-vermittelten Krankheiten wie allergischem Asthma kontrovers diskutiert [Moore et al. 2001].

Weitere Versuche sind also nötig, um die Effizienz von IL-10-kodierenden Plasmiden zur Therapie von Typ I Allergien zu evaluieren.

5. Zusammenfassung

Die Induktion regulatorischer T-Zellen (Treg) spielt im Zusammenhang mit der Kontrolle allergenspezifischer Reaktionen, insbesondere auch im Rahmen einer erfolgreichen Hyposensibilisierung mit hohen Allergendosen, eine zentrale Rolle. Die Mechanismen der Rekrutierung allergenspezifischer Treg habe ich daher in einem Mausmodell untersucht, in dem analog zur spezifischen Immuntherapie (SIT) die repetitive Verabreichung von hohen Antigendosen einen IgE-spezifischen Suppressionsmechanismus aktiviert, während die Injektion niedriger Antigendosen eine potente IgE-Antwort induziert. Die antigendosisabhängige Regulation der IgE-Produktion habe ich ebenfalls in IFN- γ - und in IL-12p40-defizienten Mäusen, welche keine Th1-Zellen generieren können, beobachtet, sodass eine verstärkte Aktivierung von Th1-Zellen in den hochdosig immunisierten Tieren als Erklärung für die Inhibition der IgE-Synthese ausgeschlossen werden kann. Zudem habe ich durch die Analyse der Zytokinproduktion von Milzzellen aus mit hohen Dosen immunisierten Mäusen darstellen können, dass im Vergleich zu niedrigdosig immunisierten Mäusen die Freisetzung sowohl von Th1- als auch von Th2-Zytokinen generell inhibiert ist.

Transferversuche mit unterschiedlichen Zellpopulationen, die aus hoch- bzw. niedrigdosig immunisierten Mäusen isoliert wurden, legen die Vermutung nahe, dass durch die Immunisierung mit hohen Antigendosen regulatorische T-Zellen induziert werden, die die IgE-Suppression vermitteln. Mittels FACS-Analysen, Realtime-PCR-Analysen sowie im Verlauf der Transferversuche wurde die Beteiligung konventioneller regulatorischer T-Zellen wie CD4⁺CD25⁺ Treg oder CD8⁺CD28⁻ Suppressor-T-Zellen ausgeschlossen. Dagegen besaßen CD4⁻CD8⁻ doppelt negative T-Zellen, welche aus hochdosig immunisierten Mäusen aufgereinigt und in naive Mäuse übertragen wurden, das Potenzial zur Inhibition der IgE-Produktion in den im Folgenden mit niedrigen Antigendosen immunisierten Rezipienten. Somit wurden erstmals CD4⁻CD8⁻ doppelt negative T-Zellen als eine die IgE-Suppression vermittelnde Zellpopulation identifiziert.

In DNA-Transferexperimenten mit der Genpistole habe ich versucht, adaptive Treg zum Zwecke der Inhibition allergenspezifischer Immunreaktionen zu induzieren. Dazu habe ich IL-10- bzw. TGF β -kodierende Plasmide hergestellt, deren Expression zum einen vom DC-spezifischen Fascin-Promotor (pFascin-IL-10, pFascin-TGF β) und zum anderen vom viralen CMV-Promotor (pCMV-IL-10, pCMV-TGF β) gesteuert

wird. Die Ko-Applikation dieser Plasmide mit einem das Modellallergen β -Galaktosidase (β Gal) unter der Kontrolle des Fascin-Promotors kodierenden Plasmid (pFascin- β Gal) sollte bei den mit den transfizierten DC interagierenden antigenspezifischen T-Zellen unter dem Einfluss der von den DC konstitutiv produzierten immunsuppressiven Zytokine zu einer verstärkten Differenzierung von Treg führen. Ich habe in vivo demonstriert, dass nach der intraepidermalen Applikation von pCMV-IL-10 die Expression von IL-10-mRNA durch CD11c⁺ DC in den drainierenden Lymphknoten signifikant erhöht ist. Tatsächlich wurden nach dreimaliger Immunisierung mit der Genpistole in Mäusen, die mit pFascin- β Gal in Kombination mit einem IL-10 kodierenden Plasmid immunisiert wurden, signifikant geringere β -Galaktosidase-spezifische Antikörpermengen gemessen als nach Immunisierung mit pFascin- β Gal allein. Auch die Zytokinproduktion durch Milz- und Lymphknotenzellen sowie die Induktion von IFN- γ produzierenden CD8⁺ Effektor-T-Zellen war in diesen Tieren signifikant supprimiert. Alle DNA-Vakzine inhibierten bei einer nachfolgenden Sensibilisierung der Tiere mit β -Galaktosidase-Protein effizient die IgG1- und IgE-Produktion. Allerdings war in solchen Mäusen keine ausgeprägte Verschiebung der Polarisierung der T-Helfer-Zellen in Richtung Th1 festzustellen, wie dies im Vergleich in den nur mit pFascin- β Gal vakzinierten Tieren beobachtet werden konnte. Hinsichtlich dieser Resultate kann man vermuten, dass die Ko-Vakzinierung mit IL-10-kodierenden Plasmiden eine Immunsuppression bewirkt, die sich in einer reduzierten Antikörperproduktion, einer verminderten Sekretion von Th1- und Th2-Zytokinen und einer geringeren CTL-Induktion manifestiert, wobei allerdings die Immunsuppression bei anschließender Sensibilisierung nicht aufrechterhalten werden kann. Dahingegen führte die Koapplikation von TGF β -kodierenden Plasmiden verbunden mit einer nachfolgenden Sensibilisierung zu einer leichten Inhibition der IgG1- und IgG2a-Produktion verglichen mit der Vakzinierung mit pFascin- β Gal allein. Dieser inhibitorische Effekt von pCMV-TGF β 1 wurde interessanterweise nicht bereits nach der DNA-Immunisierung, sondern erst nach Sensibilisierung mit dem Protein beobachtet.

6. Literaturverzeichnis

Abbas AK, Murphy KM and Sher A: Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383: 787-793.

Akasaki Y, Liu G, Chung NHC, Ehtesham M, Black KL and Yu JS: Induction of a CD4+ T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J Immunol* 2004; 173: 4352-4359.

Akdis CA and Blaser K: IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *FASEB J* 1999; 13: 603-609.

Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A and Bandeira A: CD25+CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 2001; 166: 3008-3018.

Arps V, Stephan Sudowe S and Kölsch E: Antigen dose-dependent differences in IgE antibody production are not due to polarization towards Th1 and Th2 cell subsets. *Eur J Immunol* 1998; 28: 681-686.

Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, de Waal Malefyt R, de Vries JE, Roncarolo MG: High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 1994; 179: 493-502.

Banchereau J and Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, Pulendran B and Palucka K: Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.

Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM and O'Garra A: In vitro generation of interleukin-10 producing regulatory CD4+ T-cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper Type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002; 195: 603-616.

Battaglia M, Gregori S, Bacchetta R and Roncarolo M: Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin Immunol* 2006; 18: 120-127.

Baxter AG, Kinder SJ, Hammond KJ, Scollay R, Godfrey DI: Association between $\alpha\beta$ TCR-CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 1997; 46: 572-582.

Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, Christmann S, Knop J, Saloga J: Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1131-1139.

Bellinghausen I, Sudowe S, König B, Reske-Kunz AB, Knop J, Saloga J: Interleukin-10-treated dendritic cells do not inhibit Th2 immune responses in ovalbumin/alum-sensitized mice. *Int Arch Immunol* 2006; 141: 61-69.

Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR: CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 1995; 268: 863-865.

Bennett CL, van Rijn E, Jung S, Inaba K, Steinman RM, Kapsenberg ML and Clausen BE: Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* 2005; 169: 569-576.

Bennett CL and Clausen BE: DC ablation in mice: promises, pitfalls, and challenges. *Trends in Immunology* 2007; 28: 525-531.

Bergmann C, Strauss L, Zeidler R, Lang S and Whiteside TL: Expansion of human T regulatory type 1 cells in the microenvironment of cyclooxygenase 2 overexpressing head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 8865-8873.

Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE and Brenner MB: Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 2003; 4: 1230-1237.

Brigl M and Brenner MB: CD1: Antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 817-890.

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko S, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF and Ramsdell F: Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Immunol* 2001; 27: 68-73.

Buer J, Lanoue A, Franzke A, Garcia C, von Boehmer H and Sarukhan A: Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. *J Exp Med* 1998; 187: 177-183.

Busse WW: Anti-immunoglobulin E (omalizumab) therapy in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 12-17.

Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT and Vilen BJ: B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells. *Nature Reviews* 2007; 7: 633-643.

Cardillo F, Falcão RP, Rossi MA, Mengel J.: An age-related $\gamma\delta$ T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2597-2605.

Casale TB: Anti-immunoglobulin E (omalizumab) therapy in seasonal allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 18-21.

Chai J, Tsang JYS, Lechler R, Simpson E, Dyson J and Scott D: CD4⁺CD25⁺ T cells as immunoregulatory T cells in vitro. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2365-2375.

Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R and Suci-Foca N: Tolarization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 2002; 3: 237-243.

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL: Regulatory T cell clones induced by oral tolerance : suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 265: 1237-1240.

Chen Y, Inobe J, Weiner HL: Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice : both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression. *J Immunol* 1995; 155: 910-916.

Chen LZ, G. M. Hochwald, C. Huang, G. Dakin, H. Tao, C. Cheng, W. J. Simmons, G. Dranoff and G. J. Thorbecke: Gene therapy in allergic encephalomyelitis using myelin basic protein-specific T-cells engineered to express latent TGF- β 1. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998; 95: 12516-12521.

Chen D, Maa Y and Hayes JR.: Needle-free epidermal powder immunization. *Exp Rev Vaccines* 2002; 1: 265-276.

Chitnis T, Najafian N, Abdallah KA, Dong V, Yagita H, Sayegh MH and Khoury SJ: CD28-independent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 2001; 107: 575-573.

Colovai AI, Ciubotariu R, Liu Z, Cortesini R and Suci-Foca N: CD8+CD28- T suppressor cells represent a distinct subset in a heterogeneous population. *Transplantation Proceedings* 2001; 33: 104-107.

Coombs and Gell: Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. *Clinical aspects of immunology*. Blackwell, Oxford, 1968; S. 587-592.

Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD Jr: DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 1122-1128.

Coyle AJ, Le Gros G, Bertrand C, Tsuyuki S, Heusser CH, Kopf M, Anderson GP: Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 54-59.

Coyle AJ and Gutierrez-Ramos JC: The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2001; 2: 203-209.

Cresswell P, Bangia N, Dick T, Diedrich G: The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev*; 172: 21-28.

De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M: Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur j Immunol* 1997; 27: 1229-1235.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE: Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes : An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174: 1209-1220.

Doetze A, Satoguina J, Burchard G, Rau T, Löliger C, Fleischer B, Hoerauf A: Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *Int Immunol* 2000; 12: 623-630.

Donahue JG, Greineder DK, Connor-Lacke L, Canning CF, Platt R: Utilization and cost of immunotherapy for allergic asthma and rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82: 339-347.

Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L: B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999; 5: 1365-1369.

Douillard P, Pannetier C, Josien R, Menoret S, Kourilsky P, Souillou JP, Cuturi MC: Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-V β rearrangement in heart allografts. *J Immunol* 1996; 157: 1250-1260.

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

Feng XH, Lin X, Derynck R: Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J* 2000; 19: 5178-5193.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147: 3815-3822.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY: Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-336.

Forman SB, Garrett AB: Success of omalizumab as monotherapy in adult atopic dermatitis: case report and discussion of the high-affinity immunoglobulin E receptor, FcepsilonRI. *Cutis* 2007; 80: 38-40.

Freeman: Vaccination against hay fever: report of results during the first three years. *Lancet* 1914; 183: 1178-1180.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T: Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192: 1027-1034.

Frew AJ: 25. Immunotherapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2 suppl): S712-S719.

Galli G, Nuti S, Tavarini S, Galli-Stampino L, De Lalla C, Casorati G, Dellabona P, Abrignani S: CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J Exp Med* 2003; 197: 1051-1057.

Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD: Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15: 430-435.

Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR: The regulation of immunoglobulin E class switch recombination. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 721-732.

Gilliet M and Liu YJ: Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195: 695-704.

Gleich GJ, Zimmermann EM, Gleich MC and Yunginger JW: Measurement of IgG blocking antibodies by interference in the radioallergosorbent test. *J Immunol* 1991; 126: 575.

Godfrey DI and Kronenberg M.: Going both ways : immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 2004; 114: 1379-1388.

Gogishvili T, Hahn C, Meinhard J, Hohaus A, Erb K, Sebald W, Bröcker EB, Grunewald SM: Inhibition of IL-4/IL-13 does not enhance the efficacy of allergen immunotherapy in murine allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 142: 165-174.

Gorczynski RM: Adoptive transfer of unresponsiveness to allogeneic skin grafts with hepatic $\gamma\delta$ T cells. *Immunology* 1994; 81: 27-35.

Gorelik L, Constant S, Flavell RA: Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med* 2002; 195: 1499-1505.

Gregori S, Bacchetta R, Passerini L, Levings MK, Roncarolo MG: Isolation, expansion, and characterization of human natural and adaptive regulatory T cells. *Methods Mol Biol* 2007; 380: 83-106.

Griffith TS, Kazama H, VanOosten RL, Earle JK Jr, Herndon JM, Green DR, Ferguson TA: Apoptotic cells induce tolerance by generating helpless CD8+ T cells that produce TRAIL. *J Immunol* 2007; 178: 2679-2687.

Grommé M, Uytendaele FG, Janssen H, Calafat J, van Binnendijk RS, Kenter MJ, Tulp A, Verwoerd D, Neefjes J: Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 10326-10331.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG: A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-742.

Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG: Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J Immunol* 1998; 160: 3188-3193.

Grünig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, Sheppard D, Mohrs M, Donaldson DD, Locksley RM, Corry DB: Requirement for IL-13 independently of IL-4 receptor for the treatment of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998; 282: 2261-2263

Grunewald SM, Werthmann A, Schnarr B, Klein CE, Bröcker EB, Mohrs M, Brombacher F, Sebald W, Duschl A: An antagonistic IL-4 mutant prevents type I allergy in the mouse. Inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system completely abrogates humoral immune response to allergen and development of allergic symptoms in vivo. *J Immunol* 1998; 160: 4004-4009.

Guery JC, Galbiati F, Smiroldo S, Adorini L: Selective development of T helper (Th) 2 cells induced by continuous administration of low dose soluble proteins to normal and β 2-microglobulin-deficient BALB/c mice. 1996; 183: 485-497.

Hahn C, Teufel M, Herz U, Renz H, Erb KJ, Wohlleben G, Bröcker EB, Duschl A, Sebald W, Grunewald SM: Inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system prevents allergic sensitization without affecting established allergy in a mouse model for allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 1361-1369.

Hammond KJ, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI, Baxter AG: α/β -T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 1998; 187: 1047-1056.

Harrison LC, Dempsey-Collier M, Kramer DR, Takahashi K: Aerosol insulin induces regulatory CD8 $\gamma\delta$ T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med* 1996; 184: 2167-2174.

Heath VL, Murphy EE, Crain C, Tomlinson MG, O'Garra A.: TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *Eur J Immunol* 2000; 30: 2639-2649.

Kataoka H, Takahashi S, Takase K, Yamasaki S, Yokosuka T, Koike T, Saito T: CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4. *Int Immunol* 2005; 17: 421-427.

Hoehn P, Goedert S, Germann T, Koelsch S, Jin S, Palm N, Ruede E, Schmitt E: Opposing effects of TGF-beta 2 on the Th1 cell development of naive CD4⁺ T cells isolated from different mouse strains. *J Immunol*; 1995: 155: 3788-3793.

Höllsberg P, Batra V, Dressel A, Hafler DA: Induction of anergy in CD8 T cells by B cell presentation of antigen. *J Immunol* 1996; 157: 5269-5276.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-1061.

Hornung M, Farkas SA, Sattler C, Schlitt HJ, Geissler EK: DX5⁺NKT cells induce the death of colitis-associated cells: involvement of programmed death ligand-1. *Eur J Immunol* 2006; 36: 1210-1221.

Inobe J, Slavin AJ, Komagata Y, Chen Y, Liu L, Weiner HL: IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2780-2790.

Jaffe R, DeVaughn D, Langhoff E: Fascin and the differential diagnosis of childhood histiocytic lesions. *Pediatr Dev Pathol* 1998; 1: 216-221.

Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH: Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends in Immunology* 2001; 22: 394-400.

Josien R, Douillard P, Guillot C, Müschen M, Anegon I, Chetritt J, Menoret S, Vignes C, Souillou JP, Cuturi MC: A critical role for transforming growth factor- β in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J Clin Invest* 1998; 102: 1920-1926.

Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Müller UR: Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN- γ secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 1995; 154: 4187-4194.

Keane-Myers A, Gause WC, Linsley PS, Chen SJ, Wills-Karp M: B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways are required for the development of T helper cell 2-mediated allergic airway responses to inhaled antigens. *J Immunol*. 1997; 158: 2042-2049.

Kemeny DM and Diaz-Sanchez D: Role of CD8+ T cells in rat IgE responses. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 94: 99-101.

Kendall M, Mitchell TJ, Costigan G, Armitage M, Lenzo JC, Thomas JA, von Garnier C, Zosky GR, Turner DJ, Stumbles PA, Sly PD, Holt PG, Thomas WR: Downregulation of IgE antibody and allergic responses in the lung by epidermal biolistic microparticle delivery. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 275-282.

Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, Saeland S, Davoust J, Malissen B: Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize the lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 2005; 22: 643-654.

Kitani A, Chua K, Nakamura K, Strober W: Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. *J Immunol* 2000; 15: 691-702.

Kolbe L, Heusser CH, Kölsch E: Antigen dose-dependent regulation of B epsilon-memory cell expression. *Int Arch Appl Immunol* 1991; 95: 202-206.

Kolbe L, Heusser CH, Kölsch E: Epitope-dependent nonreciprocal regulation of IgE and IgG2a antibody formation. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 103: 214-216.

Kolbe L, Heusser CH, Kölsch E: Isotype-associated recognition of allergen epitopes and its modulation by antigen dose. *Immunology* 1995; 84: 285-289.

Lawrence DA: Latent-TGF-beta: an overview. *Mol Cell Biochem* 2001; 219: 163-170.

Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, Laloux V, Carnaud C, Bendelac A, Bach JF, Monteiro RC: Overexpression of natural killer cells protects V α 14-J α 18 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med* 1998; 188: 1831-1839.

Levine BB and Vaz NM: Effect of combinations of inbred strain, antigen and antigen dose on immun responsiveness and reagin production in the mouse. A potential mouse model for immune aspects of human atopic allergy. *Int Arch Allergy* 1970; 39: 156-171.

Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG: IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human Type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 2001; 166: 5530-5539.

Lewis DB: Allergy immunotherapy and inhibition of Th2 immune responses: a sufficient strategy? *Curr Opin Immunol* 2002;14:644-651

Lingnau K, Hoehn P, Kerdine S, Koelsch S, Neudoerfl C, Palm N, Ruede E, Schmitt E: IL-4 in combination with TGF-beta favors an alternative pathway of Th1 development independent of IL-12. *J Immunol* 1998; 161: 4709-4718.

Liu Z, Yu B, Fan J, Cortesini R, Suci-Foca N: CD8⁺CD28⁻ T cells suppress alloresponse of CD4⁺ T cells both in primates and rodents. *Transplantation Proceedings* 2001; 33: 82-83.

Londei M, Verhoef A, De Berardinis P, Kissonerghis M, Grubeck-Loebenstein B, Feldmann M: Definition of a population of CD4⁺CD8⁻ T cells that express the $\alpha\beta$ T-cell receptor and respond to interleukins 2, 3, and 4. *Proc nat Acad Sci USA* 1989; 86: 8502-8506.

Ludwig-Portugall I, Montermann E, Kremer A, Reske-Kunz AB, Sudowe S: Prevention of long-term IgE-antibody production by gene gun-mediated DNA vaccination. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 951-957.

Lund R, Aittokallio T, Nevalainen O, Lahesmaa R: Identification of novel genes regulated by IL-12, IL-4, or TGF-beta during the early polarization of CD4⁺ lymphocytes. *J Immunol* 2003; 171: 5328-5336.

Maizels RM and Yazdanbakhsh M: Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 733-744.

Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L: CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2R β deficient mice: implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 2002; 17: 167-178.

Maloy KJ and Powrie F: regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2: 816-822.

Mangan NE, Fallon RE, Smith P, van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG: Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *J Immunol* 2004; 173: 6346-6356.

Maurer D, Fiebiger E, Reininger B, Wolff-Winiski B, Jouvin MH, Kilgus O, Kinet JP, Stingl G: Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc ϵ R1) on monocytes of atopic individuals. *J Exp Med* 1994; 179: 745-750.

McMenamin C, Pimm C, McKersey M, Holt PG: Regulation of IgE responses to inhaled antigenic mice by antigen-specific $\gamma\delta$ T cells. *Science* 1994; 265: 1869-1971.

Mendiratta SK, Martin WD, Hong S, Boesteanu A, Joyce S, Van Kaer L: CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL4. *Immunity* 1997; 6: 469-477.

Mizoguchi A and Bhan AK: A case for regulatory B cells. *J Immunol* 2006; 176: 705-710.

Miller C, Ragheb JA, Schwartz RH: Anergy and cytokine-mediated suppression as distinct superantigen-induced tolerance mechanisms in vivo. *J Exp Med* 1999; 190: 53-64.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A: Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.

Morjaria JB, Gnanakumaran G, Babu KS: Anti-IgE in allergic asthma and rhinitis: an update. *Expert Opin Biol Ther.* 2007; 7: 1739-1747.

Morokata T, Ishikawa J, Yamada T: Antigen dose defines T helper 1 and T helper 2 responses in the lungs of C57BL/6 and BALB/c mice independently of splenic responses. *Immunological Letters* 2000; 72: 119-126.

Mosmann TR and Coffman RL: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-173.

Mosmann TR and Sad S: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-146.

Neuman MG: Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res* 2007; 149: 173-86.

Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stüber E, Strober W: Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995; 182: 1281-1290.

Nir Y, Paz A, Sabo E, Potasman I: Fear of injections in young adults : prevalence and associations. *Am J Med Hyg* 2003; 68: 341-344.

Noble A, Giorgini A, Leggat JA: Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. *Blood* 2006; 107: 4475-4483.

- Novak J**, Beaudoin L, Griseri T, Lehuen A: Inhibition of T cell differentiation into effectors by NKT cells requires cell contacts. *J Immunol* 2005; 174: 1954-1961.
- Oderda G**, Vivenza D, Rapa A, Boldorini R, Bonsignori I, Bona G: Increased interleukin-10 in *Helicobacter pylori* infection could be involved in the mechanism protecting from allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45: 301-305.
- O'Garra A**, Chang R, Go N, Hastings R, Haughton G, Howard M: Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol* 1992; 22: 711-717.
- Paraiso KH**, Ghansah T, Costello A, Engelman RW, Kerr WG: Induced SHIP deficiency expands myeloid regulatory cells and abrogates graft-versus-host disease. *J Immunol* 2007; 178: 2893-2900.
- Pfeiffer C**, Stein J, Southwood S, Ketelaar H, Sette A, Bottomly K: Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. *J Exp Med* 1995; 181: 1569-1574.
- Piconi S**, Trabattoni D, Saresella M, Iemoli E, Schenal M, Fusi A, Borelli M, Chen L, Mascheri A, Clerici M: Effects of specific immunotherapy on the B7 family of costimulatory molecules in allergic inflammation. *J Immunol* 2007; 178: 1931-1937.
- Porgador A**, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN: Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med* 1998; 188: 1075-1082.
- Raimondi G**, Zanoni I, Citterio S, Ricciardi-Castagnoli P, Granucci F: Induction of peripheral T cell tolerance by antigen-presenting B cells. I Relevance of antigen presentation persistence. *J Immunol* 2006; 176: 4012-4020.
- Read S**, Malmström V, Powrie F: Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD4(+)CD25(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000; 192: 295-302.
- Reis e Sousa C**, Germain RN: Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med*. 1995; 182: 841-851.
- Rihet P**, Demeure CE, Dessein AJ, Bourgois A: Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemic area. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2063.
- Roilides E**, Katsifa H, Tsaparidou S, Stergiopoulou T, Panteliadis C, Walsh TJ: Interleukin-10 suppresses the phagocytic and antihyaluronic activities of human neutrophils. *Cytokine* 2000; 12: 379-387.
- Ross R**, Ross XL, Schwing J, Längin T, Reske-Kunz AB: The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 1998; 160: 3776-3782.

Ross R, Jonuleit H, Bros M, Ross XL, Yamashiro S, Matsumura F, Enk AH, Knop J, Reske-Kunz AB: Expression of the actin-bundeling protein fascin in cultured human dendritic cells correlates with dendritic morphology and cell differentiation. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 658-663.

Ross R, Sudowe S, Beisner J, Ross XL, Ludwig-Portugall I, Steitz J, Tüting T, Knop J, Reske-Kunz AB: Transcriptional targeting of dendritic cells for gene therapy using the promoter of the cytoskeletal protein fascin. *Gene Therapy* 2003; 10: 1035-1040.

Rouse BT and Suvas S: Regulatory T cells and immunity to pathogens. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 1301-1309.

Saito T and Yamasaki S: Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. *Immunol rev* 2003; 192: 143-160.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expression IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164.

Sakaguchi S: Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu rev Immunol* 2004; 22: 531-562.

Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hiwada K: Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma. *Clin Exp Immunol* 1999; 118: 9-15.

Salomon B and Bluestone JA: Complexities of CD28/B7 : CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 225.

Satoguina JS, Weyand E, Larbi J, Hoerauf A: T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J Immunol* 2005; 174: 4718-4726.

Sarinho E, Cruz AA: Anti-IgE monoclonal antibody for the treatment of the asthma and other manifestations related to allergic diseases. *J Pediatr (Rio J)*. 2006; 82(5 Suppl): 127-132.

Schif-Zuck S, Westermann J, Netzer N, Zohar Y, Meiron M, Wildbaum G, Karin N: Targeted overexpression of IL-18 binding protein at the central nervous system overrides flexibility in functional polarization of antigen-specific Th2 cells. *J Immunol* 2005; 174: 4307-4315.

Schif-Zuck S, Wildbaum G, Karin N: Coadministration of plasmid DNA constructs encoding an encephalogenic determinant and IL-10 elicits regulatory T cell-mediated protective immunity in the central nervous system. *J Immunol* 2006; 177: 8241-8247.

Schmitt E, Germann T, Goedert S, Hoehn P, Huels C, Koelsch S, Kühn R, Müller W, Palm N, Rüde E: IL-9 production of naive CD4⁺ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J Immunol* 1994; 153: 3989-3996.

Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT: Allergen immunotherapy decreases interleukin-4 production in CD4⁺ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 1993; 178: 2123-2130.

Seder RA, Marth T, Sieve MC, Strober W, Letterio JJ, Roberts AB, Kelsall B: Factors involved in the differentiation of TGF β -producing cells from naïve CD4⁺ T cells: IL-4 and IFN- γ have opposing effects, while TGF- β positively regulates its own production. *J Immunol* 1998; 160: 5719-5728.

Seddon B and Mason D: Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45RC(-) cells and CD4(+)CD8(-) thymocytes. *J Exp Med* 1999; 189: 279-288.

Seo N and Egawa K: Suppression of cytotoxic T lymphocyte activity by γ/δ T cells in tumor-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother* 1995; 40: 358-366.

Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S: Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 2005; 201: 723-735.

Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Sondhi J, Naidenko OV, Kronenberg M, Koezuka Y, Delovitch TL, Gombert JM, Leite-De-Moraes M, Gouarin C, Zhu R, Hameg A, Nakayama T, Taniguchi M, Lepault F, Lehuen A, Bach JF, Herbelin A: Activation of natural killer T cells by α -galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type I diabetes. *Nat Med* 2001; 7: 1057-1062.

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S: Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; 3: 135-142.

Spector SL, Tan RA: Effect of omalizumab on patients with chronic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007 ; 99: 190-193.

Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH: Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997; 159: 4772-4780.

Stoecklinger A, Grieshuber I, Scheiblhofer S, Weiss R, Ritter U, Kissenpfennig A, Malissen B, Romani N, Koch F, Ferreira F, Thalhamer J, Hammerl P: Epidermal Langerhans cells are dispensable for humoral and cell-mediated immunity elicited by gene gun immunization. *J Immunol* 2007; 179: 886-893.

Strachan DP: Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med* 1989; 299: 1259-1260.

Strobl H and Knapp W: TGF- β 1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect* 1999; 1: 1283-1290.

Stuber E, Strober W, Neurath M: Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. *J Exp Med* 1996; 183: 693-698.

Sudowe S, Specht C, Kolbe L, Kölsch E: *In situ* dormancy of B lymphocytes programmed for an IgE antibody response and their sudden release from unresponsiveness under *in vitro* conditions. *Int Immunol* 1995; 7: 1799-1807.

Sudowe S, Ludwig-Portugall I, Montermann E, Ross R, Reske-Kunz AB: Transcriptional targeting of dendritic cells in gene gun-mediated DNA immunization favors the induction of type 1 immune responses. *Mol Ther* 2003; 8: 567-575.

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

Sun D, Qin Y, Chluba J, Epplen JT, Wekerle H: Suppression of experimental induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T cell interactions. *Nature* 1988; 332: 843-845.

Sundstedt A, Höiden I, Rosendahl A, Kalland T, van Rooijen N, Dohlsten M: Immunoregulatory role of IL-10 during superantigen-induced hyporesponsiveness in vivo. *J Immunol* 1997; 158: 180.

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

Thornton AM and Shevach EM: CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin-2 production. *J Exp Med* 1998; 188: 287-296.

Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR: Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 1025-1034.

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

Tsitoura DC, Yeung VP, DeKruyff RH, Umetsu DT: Critical role of B cells in the development of T cell tolerance to aeroallergens. *Int Immunol* 2002; 14: 659-667.

Tsuyuki S, Tsuyuki J, Einsle K, Kopf M, Coyle AJ: Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness. *J Exp Med*. 1997; 185: 1671-9.

Ulloa L, Doody J, Massagué J: Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 1999; 397: 710-713.

Umetsu DT and DeKruyff RH: Th1 and Th2 CD4+ cells in human allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 1-6.

Van Oosterhout AJ, Van Esch B, Hofman G, Hofstra CL, Van Ark I, Nijkamp FP, Kapsenberg ML, Savelkoul HF, Weller FR: Allergen immunotherapy inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness associated with decreased IL-4 production by lymphocytes in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 622-628.

Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, deVries JE, Roncarolo MG, Mosmann TR, Moore KW: Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: Homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991; 88: 1172-1176.

Vincent MS, Leslie DS, Gumperz JE, Xiong X, Grant EP, Brenner MB: CD1-dependent dendritic cell instruction. *Nat Immunol* 2002; 3: 1163-1168.

Vissers JL, van Esch BC, Hofman GA, Kapsenberg ML, Weller FR, van Oosterhout AJ: Allergen immunotherapy induces a suppressive memory response mediated by IL-10 in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 1204-1210

Vukmanovic-Stejić M, Thomas MJ, Noble A, Kemeny DM: Specificity, restriction and effector mechanisms of immunoregulatory CD8 T cells. *Immunology* 2001; 102: 115-122.

Wang LF, Lin JY, Hsieh KH, Lin RH: Epicutaneous exposure of protein antigen induces a predominant Th2-like response with high IgE-production in mice. *J Immunol* 1996; 156: 4077-4082.

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW: Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* 1995; 270: 985-988.

Weiner HL: Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes and Infection* 2001; 3: 947-954.

Wildbaum G, Netzer N, Karin N: Tr1 cell-dependent active tolerance blunts the pathogenic effect of determinant spreading. *J Clin Invest* 2002; 110: 701-710.

Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME: X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001; 27: 18-20.

Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW: Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 1995; 3: 521-530.

Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD: Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998; 282: 2258-2261.

Yazdanbakhsh M, van den Biggelaar A, Maizels RM: Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol* 2001; 22: 372-377.

Zhang J, Medaer R, Stinissen P, Hafler D, Raus J: MHC-restricted depletion of human myelin basic protein-reactive T cells by T cell vaccination. *Science* 1993; 261: 1451-1454.

Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L: Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 2000; 6: 782-789.

Zhang ZX, Ma Y, Wang H, Arp J, Jiang J, Huang X, He KM, Garcia B, Madrenas J, Zhong R: Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas-ligand-independent pathway. *J Immunol* 2006; 177: 6920-6929.

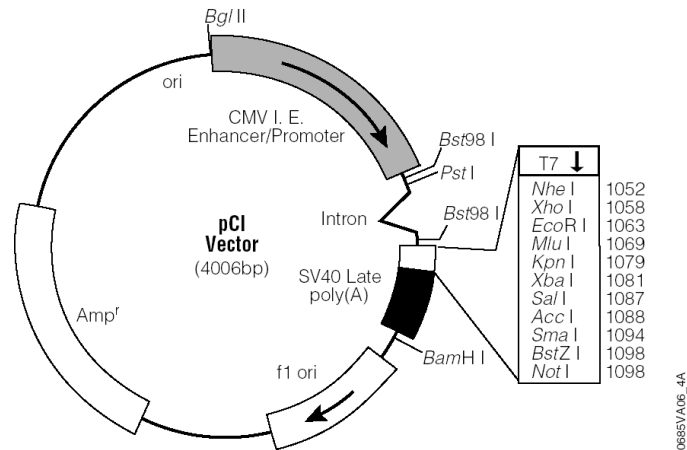
Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM: Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes : *Blood* 2006; 107: 3025-3932.

Zheng SG, Wang JH, Koss MN, Quismorio F Jr, Gray JD, Horwitz DA: CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells generated ex vivo with IL-2 and TGF- β suppress a stimulatory graft-versus-host disease with a lupus-like syndrome. *J Immunol* 2004; 172: 1531-1539.

Zindler E, Gehrke N, Luft C, Reuter S, Taube C, Finotto S, Reske-Kunz AB, Sudowe S: Divergent Effects of Biolistic Gene Transfer in a Mouse Model of Allergic Airway Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 38: 38-46.

D Anhang

D.1 Vektor pCI (Promega)



pCI Mammalian Expression Vector sequence reference points.

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

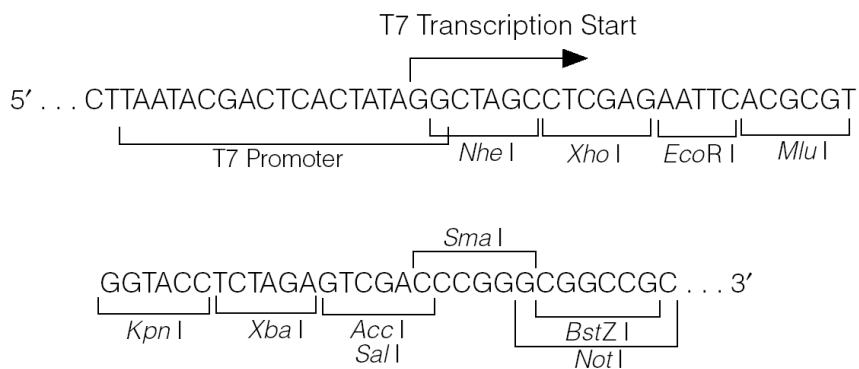
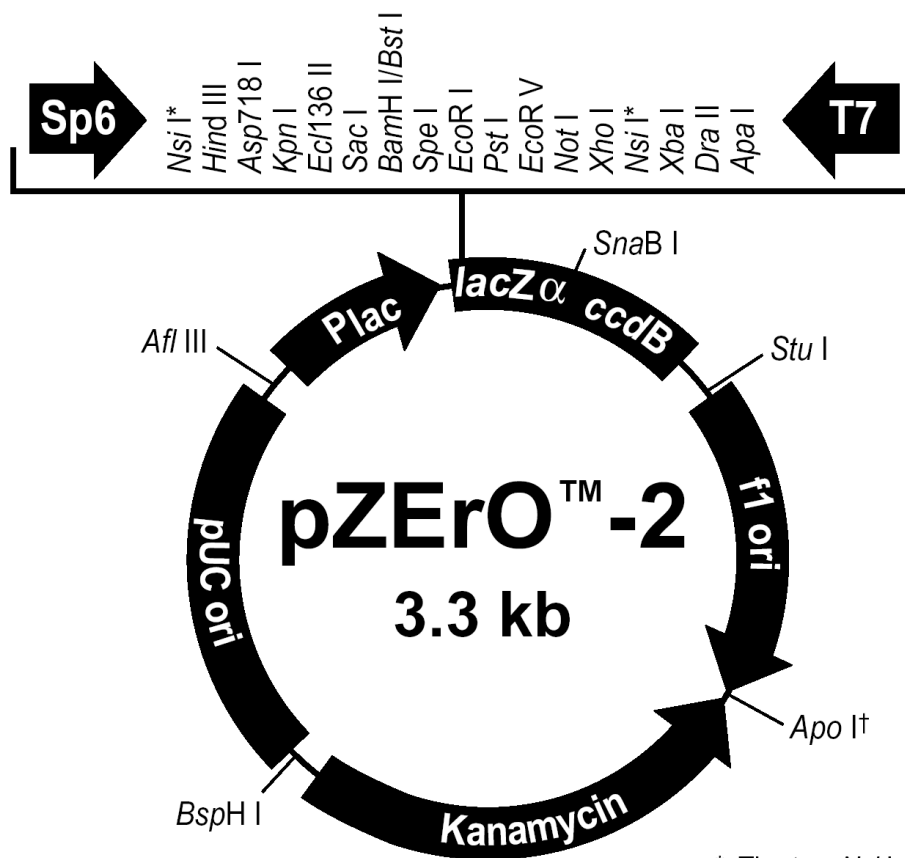


Figure 1. Multiple cloning region sequence and T7 promoter of the pCI Mammalian Expression Vector. The sequence shown corresponds to RNA synthesized by T7 RNA polymerase. The strands shown are the same as the ssDNA strands produced by the pCI Vector.

D.2 Vektor pZErO™-2 (Invitrogen™ life technologies)



Comments for pZErO™-2 3297 nucleotides

Lac Promoter/Operator Region: bases 95-216
 M13 Reverse Priming Site: bases 205-221
LacZα ORF: bases 217-558
 Sp6 Promoter/Priming Site: bases 239-256
 Multiple Cloning Site: bases 269-381
 T7 Promoter/Priming Site: bases 388-407
 M13 (-20) Forward Priming Site: bases 415-430
 M13 (-40) Forward Priming Site: bases 434-450
 Fusion Joint: bases 559-567
ccdB Lethal Gene ORF: bases 568-870
 f1 origin: bases 895-1307
 Kanamycin Resistance ORF: bases 2116-1322 (C)
 pUC origin: bases 2502-3175

* The two *Nsi* I sites in the MCS are the only sites in the vector.

† There are two tandem *Apo* I sites at this location. *Apo* I also recognizes the *EcoR* I site.

E Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHR	Atemwegshyperreaktivität
Amp	Ampicillin
BAL	Bronchioalveoläre Lavage
BALF	BAL-Flüssigkeit
bio	biotinyliert
bp	Basenpaare
BZ	B-Zelle
bzw.	Beziehungsweise
βGal	β-Galaktosidase
cDNA	complementary DNA
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DC	Dendritische Zelle
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DTAF	Dichlorotriazinyl Amino Fluorescein
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ELISpot	enzyme linked immunospot assay
E:Z	Effektorzellen zu Zielzellen
FACS	fluorescence activated cell scan
FITC	Fluorescein
h	Stunde
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	internal ribosomal entry sequence
K01	Mäuse, die mit 0,1 µg KLH adsorbiert an Alum i.p. immunisiert wurden
K100	Mäuse, die mit 100 µg KLH adsorbiert an Alum i.p. immunisiert wurden
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
KLH	keyhole limpet hemocyanine
LN	Lymphknoten
LNC	Lymphknotenzellen

MCS	multiple cloning site
min	Minute
mRNA	messenger RNA
O 1	Mäuse, die mit 1 µg OVA adsorbiert an Alum i.p. immunisiert wurden
O 1000	Mäuse, die mit 1 mg OVA adsorbiert an Alum i.p. immunisiert wurden
ORF	open reading frame
OVA	Ovalbumin
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
Pen	Penizillin
Psi	pound per square inches
RBL	Rat Basophilia Leukemia
Res	Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SA-PO	Streptavidin-Peroxidase
SC	Milzzellen
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
Std.	Stunde
Strep	Streptomycin
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGFβ	transforming growth factor beta
Treg	regulatorische T-Zellen
TZ	T-Zelle
u.a.	unter anderem
upm	Umdrehungen pro Minute
z.B.	zum Beispiel

F Lebenslauf

1 Persönliche Daten

Christina Barwig
geboren am 28. Oktober 1978 in Mainz
Geburtsname Priesmeyer

2 Schulbildung

1985-1989 Grundschule Mühlschule Heidesheim

1989-1998 Frauenlobgymnasium in Mainz
23.06.1998 Abitur

2 Studium

10.1999-02.2004 Biologie-Studium an der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz
10.09.2001 Vordiplom
13.05.2004 Diplom

03.2004 Beginn der Promotionsarbeit an der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz, Hautklinik, Klinische Forschergruppe
Allergologie

2 Tätigkeiten

04.2003-07.2003 Wiss. Hilfskraft an der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz im Fachbereich Biologie, Abteilung Biologie für
Mediziner

08.2003-02.2004 Wiss. Hilfskraft an der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz im Fachbereich Medizin, Institut für Immunologie

03.2004-12.2007 Wiss. Angestellte an der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz, Hautklinik, Klinische Forschergruppe Allergologie