

**Beeinflussung der  
menschlichen allergischen Immunantwort  
durch Allergen-DNA-transfizierte  
dendritische Zellen**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Bettina Klostermann  
geboren in Mainz

Mainz, im Dezember 2003

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden von September 2000 bis September 2003 an der Universitäts-Hautklinik der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz erarbeitet.

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. Paulsen

Erster Berichterstatter:

Zweiter Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2004

**Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung eingereicht:**

Klostermann, B., Bellinghausen, I., Böttcher I., Petersen, A., Becker, W.-M., Knop, J., Saloga, J.: Modification of the human allergic immune response by allergen-DNA-transfected dendritic cells in vitro, *J. Allergy Clin. Immunol. (in Druck)*

**Kongressbeiträge:**

Klostermann, B., Bellinghausen, I., Böttcher, I., Petersen, A., Becker, W.-M., Knop, J., Saloga, J: Modification of the human allergic immune response by allergen-DNA-transfected dendritic cells in vitro. *30. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung*, Frankfurt, 27. Februar – 01. März 2003. Vortrag und Abstract

Klostermann, B., Bellinghausen, I., Böttcher, I., Petersen, A., Becker, W.-M., Knop, J., Saloga, J: Allergen-DNA-transfizierte dendritische Zellen als Werkzeuge zur Beeinflussung der menschlichen allergischen Immunantwort. *15. Mainzer Allergieworkshop, Mainz, 14.-15. März 2003*. Vortrag und Abstract

Klostermann, B., Bellinghausen, I., Böttcher, I., Petersen, A., Becker, W.-M., Knop, J., Saloga: Allergen-DNA-transfected dendritic cells - a tool to influence the human allergic immune response. *International Investigative Dermatology 2003, Miami Beach, 30. April – 03. Mai 2003*. Poster und Abstract

Klostermann, B., Bellinghausen, I., Böttcher, I., Petersen, A., Becker, W.-M., Knop, J., Saloga, J: Modifikation der humanen allergischen Immunantwort durch Allergen-DNA-transfizierte dendritische Zellen. *42. Tagung der Deutsch Dermatologischen Gesellschaft, Berlin, 06. – 10. Mai 2003*. Poster und Abstract

## Abkürzungen:

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
ABTS	2,2-Azino-bis (3-ethyl-benz-thiazolin-6-sulfonsäure)
Ad-EGFP	„adenovirus encoding EGFP “
Ad-Phl p1	„adenovirus encoding Phl p 1“
APC	antigenpräsentierende Zellen
Bet v 1	Hauptantigen der Birkenpollen
BSA	bovines Serumalbumin
CD	„cluster of differentiation“
CTL	zytotoxische T-Zelle
CTLA-4	„cutaneous lymphocyte-associated antigen
cpm	„counts per minute“
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
ELISA	„enzyme linked immunosorbent protein assay“
FACS	„fluorescence activated cell sorter“
FCS	„fetal calf serum“
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	„granulocyte-makrophage colony stimulating factor “
HLA-DR	humanes Leukozyten Antigen, MHC-Klasse II-Molekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Antikörper-gebundene paramagnetische Mikrobeads
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	„major histocompatibility complex “
MOI	„multiplicity of infection“

NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBMC	mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PBS	„phosphate buffered saline“
PE	Phycoerythrin
PGE	Prostaglandin
Phl p 1	Phleum pratense 1
upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIT	spezifische Immuntherapie
T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2	T-Helferzelle (Typ I oder Typ II)
TLR	„toll-like receptor“
TNF	Tumornekrosefaktor
TRP-2	„tyrosinase-related protein 2“
U	„Units“

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1. Das Immunsystem .....	1
2. Das $T_H1$ - $T_H2$ -Gleichgewicht und die Antigenpräsentation dendritischer Zellen.....	3
3. Allergien.....	7
4. Allergene .....	10
5. Sensibilisierungs- und Auslösephase der Allergie .....	10
6. Therapien.....	12
7. Adenoviren .....	15
8. Zielsetzung der Arbeit.....	16
<b>II. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>17</b>
<b>1. Material .....</b>	<b>17</b>
1.1 Laborgeräte.....	17
1.2 Software .....	18
1.3 Verwendete Gebrauchsartikel.....	18
1.4 Chemikalien und Reagenzien .....	19
1.5 Antikörper .....	22
1.6 Puffer und Medien .....	24
1.6.1 Medien für die Zellkultur .....	24
1.6.2 Medien für die Bakterienkultur.....	25
1.6.3 Puffer .....	25
1.7 Allergene .....	29
1.8 Zytokine .....	29
1.9 Plasmide .....	29
1.10 Zelllinien .....	30
1.10.1 293 Zellen .....	30
1.10.2 Cre <sup>+</sup> -Zellen.....	31
1.11 Allergiker.....	31
<b>2. Methoden .....</b>	<b>32</b>
2.1 Zellbiologische Methoden .....	32
2.1.1 Allgemein.....	32
2.1.2 Bestimmung der Lebendzahl durch Trypanblaufärbung .....	32
2.1.3 Kryokonservierung.....	32
2.1.4 Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) .....	33
2.1.5 Zellseparation und Kultivierung allergengepulster dendritischer Zellen .....	34
2.1.5.1 Isolation von Monozyten.....	34
2.1.5.2 Kultivierung allergengepulster dendritischer Zellen .....	34
2.1.5.3 Isolation von T-Zellen .....	35
2.2 Zellcharakterisierung .....	35
2.2.1 Durchflußzytometrie .....	36

2.4 Proliferationstests .....	36
2.4.1 Allergenpräsentation transfizierter dendritischer Zellen .....	37
2.5 Bestimmung der Zytokinproduktion mittels ELISA .....	37
2.7 Molekularbiologische Experimente .....	39
2.7.1 Plasmidexpansion und Aufreinigung .....	39
2.7.1.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien .....	39
2.7.1.2 Bakterientransformation .....	39
2.7.1.3 Übernachtskultur und Kryokonservierung positiver Klone .....	40
2.7.1.4 Plasmid-Minipräparation .....	40
2.7.1.5 DNA-Probegels .....	41
2.7.1.6 Plasmid-Maxipräparation .....	41
2.7.2 Vermehrung und Aufreinigung rekombinanter Adenoviren .....	41
2.7.2.1 Zellkultur von 293- und Cre8-Zellen .....	41
2.7.2.2 Vermehrung rekombinanter Adenoviren .....	42
2.7.2.3 Aufreinigung von Adenoviren .....	42
2.7.2.4 Photometrische Quantifizierung einer Adenoviruspräparation .....	43
2.7.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz .....	43
2.7.3.1 Messung der EGFP-Expression .....	43
2.7.3.2 Bestimmung der Proteinexpression mittels Western-Blot .....	43

### **III. ERGEBNISSE ..... 46**

<b>1. Bestimmung der Transfektionseffizienz nach Transfektion der dendritischen Zellen mit Ad-EGFP .....</b>	<b>46</b>
<b>2. Bestimmung der Viabilität transfizierter dendritischer Zellen .....</b>	<b>47</b>
<b>3. Charakterisierung der für die Allergenpräsentation eingesetzten Zellen .....</b>	<b>47</b>
3.1 Vergleich transfizierter und nicht-transfizierter dendritischer Zellen .....	47
3.2 Phänotyp der dendritischen Zellen während der Kultur .....	48
3.3 Durch adenovirale Transfektion wird in unreifen dendritischen Zellen keine Ausreifung induziert .....	50
.....	51
3.4 Phänotyp und Morphologie der verwendeten T-Zellen .....	51
<b>4. Expression der Allergenpeptide .....</b>	<b>52</b>
<b>5. Induktion einer T-Zellproliferation durch transfizierte dendritische Zellen .....</b>	<b>53</b>
5.1 Induktion einer Proliferation von autologen CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen durch Allergen-DNA transfizierte dendritische Zellen .....	53
5.2 Induktion einer Proliferation von autologen CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen durch Allergen-DNA transfizierte dendritische Zellen .....	55
<b>6. Zytokinproduktion der T-Zellen nach Stimulation mit adenoviral transfizierten dendritischen Zellen .....</b>	<b>56</b>
6.1 Zytokinproduktion der CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen .....	56
6.2 Zytokinproduktion der CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen .....	58
<b>7. Zytokinproduktion der eingesetzten dendritischen Zellen .....</b>	<b>59</b>
7.1 IL-6- und IL-12p40-Produktion von unreifen dendritischen Zellen .....	59
7.2 IL-6- und IL-12p40-Produktion von reifen dendritischen Zellen .....	61

### **IV. DISKUSSION ..... 63**

<b>V. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>73</b>
<b>VI. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>82</b>



# I. Einleitung

## **1. Das Immunsystem**

Das Immunsystem verteidigt den Organismus gegen Infektionen. Es richtet sich normalerweise gegen Antigene, gewöhnlich Proteine von Bakterien oder anderen Krankheitserregern. Es lässt sich in zwei Teile aufteilen, erstens die angeborene Immunität und zweitens die erworbene oder adaptive Immunität. Alle an einer Immunreaktion beteiligten Zellen entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Aus einer lymphatischen Vorläuferzelle entwickeln sich die T- und B-Lymphozyten. Diese differenzieren an unterschiedlichen Orten aus. T-Lymphozyten stammen aus dem Thymus, während die B-Lymphozyten im Knochenmark gebildet werden. Monozyten, dendritische Zellen, Basophile, Neutrophile und Eosinophile haben eine myeloide Zelle als gemeinsame Vorläuferzelle.

Die angeborene Immunität dient der ersten Abwehr, sie ist nicht spezifisch und kann keinen Schutz vor weiteren Infektionen bilden. Sie richtet sich gegen eingedrungene Mikroorganismen, die sie aber nicht immer vollständig beseitigen kann. Die angeborene Immunantwort kontrolliert die Infektion so lange, bis die adaptive Immunantwort einsetzt, was vier bis sieben Tage dauern kann. Tritt ein Bakterium in den Körper ein, wird es von phagozytierenden Makrophagen aufgenommen. Dies geschieht mit Hilfe von Rezeptoren, die bakterielle Moleküle erkennen. Dadurch werden weitere Makrophagen aktiviert und die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen beginnt. Diese freigesetzten Botenstoffe lösen die eigentliche Entzündungsreaktion aus. Eine Entzündung ist definiert durch Schwellung, Rötung, Schmerz und Wärme. Die Blutgefäße erweitern sich und deren Durchlässigkeit erhöht sich, so dass es zu einer verstärkten Durchblutung kommt. An späteren Entzündungsreaktionen sind auch Lymphozyten beteiligt, die mittlerweile durch das Antigen aktiviert wurden und durch die ausgeschütteten Zytokine zum Infektionsherd gelockt wurden (1).

Im Vergleich zur angeborenen ist die erworbene Immunität spezifisch und in der Lage ein immunologisches Gedächtnis auszubilden, das bei einer erneuten Infektion sehr schnell aktiviert wird und so den Organismus schützt. T-Zellen patrouillieren als naive

T-Zellen, die noch keinen Kontakt mit einem Antigen hatten, andauernd vom Blut in die peripheren lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Milz, mucosaassoziierte lymphatische Gewebe) und wieder zurück ins Blut. Treffen die T-Zellen dabei auf ein Antigen, das ihnen von antigenpräsentierenden Zellen auf deren Oberfläche präsentiert wird, werden sie festgehalten und aktiviert. Antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen) phagozytieren Erreger und zerlegen sie in antigene Peptide. Mit Hilfe des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC) werden diese zerlegten Peptide an der Zelloberfläche der antigenpräsentierenden Zelle präsentiert und von T-Zellen, die spezifische Rezeptormoleküle tragen, die alle eine andere Peptid-MHC-Kombination erkennen, erkannt. Dadurch werden die T-Zellen aktiviert, teilen sich und geben Lymphokine ab. Diese Botenstoffe aktivieren die B-Zellen, die ebenfalls spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche haben. Mit diesen Rezeptoren können die B-Zellen nicht nur MHC-gebundene Antigene erkennen sondern auch freie Antigene, bzw. bestimmte Strukturen des Antigens. Nach der Aktivierung teilen sich auch die B-Zellen und differenzieren zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen aus. Antikörper sind frei lösliche Formen der B-Zell-Rezeptoren. Treffen sie auf ein Antigen, binden sie es und neutralisieren das Antigen oder fördern seinen Abbau durch das Komplementsystem oder aber durch Fresszellen (wie z.B. Makrophagen) (2).

Zwei Klassen von MHC-Molekülen transportieren die Peptidfragmente aus verschiedenen Zellkompartimenten und präsentieren sie zwei verschiedenen Typen von T-Zellen, diese unterscheiden sich in der Expression eines Oberflächenmarkers und durch die Klassen von MHC-Molekülen, die sie erkennen.

Die eine Gruppe der T-Zellen exprimiert den Marker CD8 und werden daher CD8<sup>+</sup>- oder cytotoxische T-Zellen genannt. Sie sind an Abwehrreaktionen gegen endogene Antigene wie Viren beteiligt. Sind Zellen mit einem Virus infiziert, werden im Cytoplasma virale Proteine synthetisiert, Peptide davon werden in das Endoplasmatische Reticulum transportiert, wo sie an MHC-Klasse I-Moleküle binden, die diese dann an der Oberfläche präsentieren (3). Dieser MHC-Antigen-Komplex wird von CD8<sup>+</sup> cytotoxischen T-Zellen erkannt, die dann die infizierte Zelle abtöten.

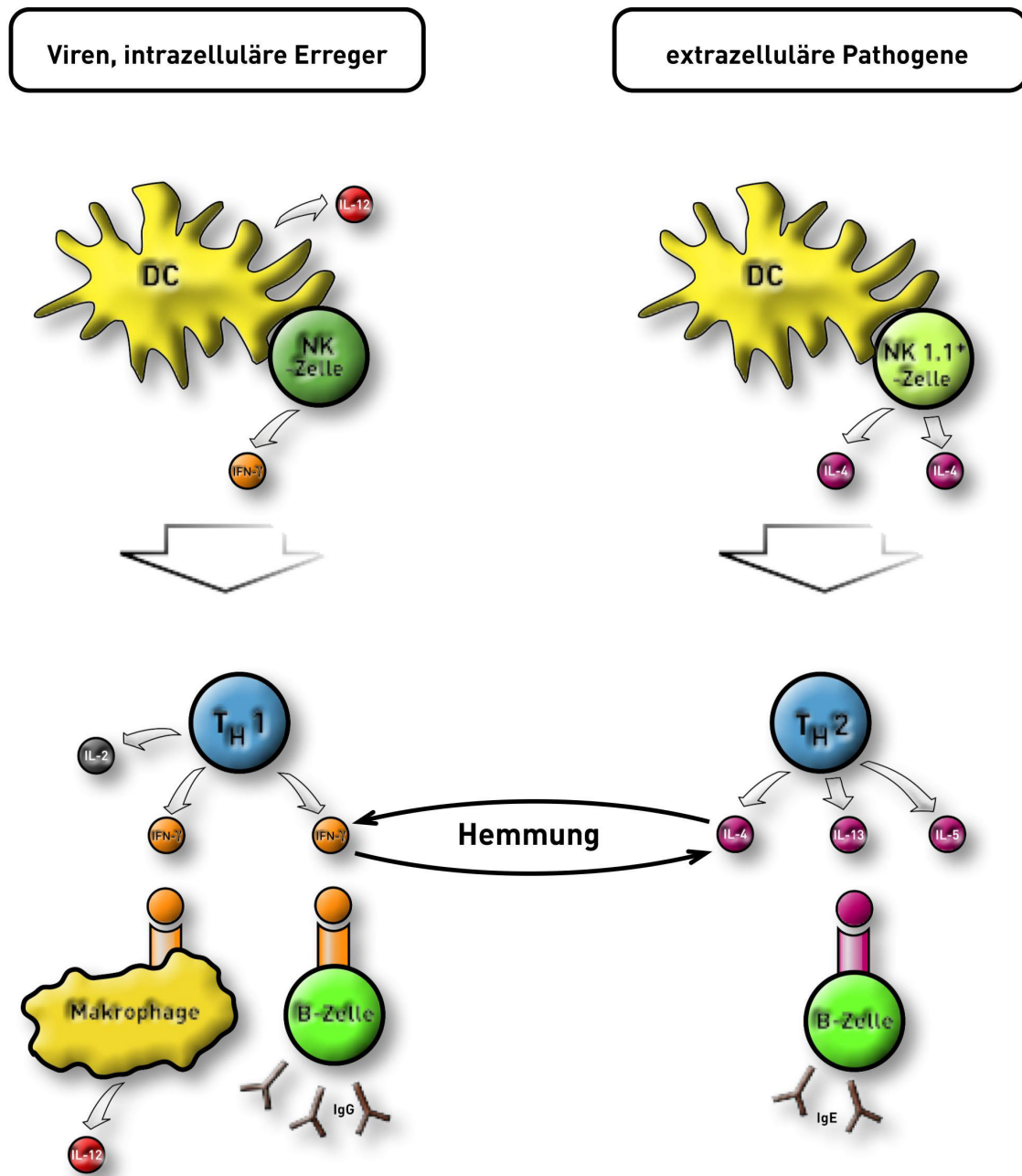
Die andere Gruppe trägt den Marker CD4 auf ihrer Oberfläche und wird entsprechend als CD4<sup>+</sup>- oder T-Helferzelle bezeichnet. Sie treten auf, wenn exogene Erreger wie

Bakterien den Organismus befallen. Einige Bakterien infizieren Zellen und dringen in Vesikel ein, solche Peptide werden vom MHC-Klasse II-Komplex präsentiert. Diese binden und transportieren aber auch Peptide, die von einem Antigen stammen, das von einem B-Zell-Antigenrezeptor gebunden wurde und in intrazelluläre Vesikel aufgenommen wurde. Die Peptid-MHC-Klasse II-Komplexe werden von  $CD4^+$  T-Helferzellen erkannt.

## **2. Das $T_H1$ - $T_H2$ -Gleichgewicht und die Antigenpräsentation dendritischer Zellen**

$CD4^+$ -T-Zellen wiederum lassen sich unterteilen in  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen. Die Entscheidung, zu welcher Zelle sie ausdifferenzieren, fällt nach dem Kontakt mit dem Antigen. Werden sie zu  $T_H1$ -Zellen, kommt es zu einer zellvermittelten Immunantwort, differenzieren sie zu  $T_H2$ -Zellen wird eine humorale Immunantwort induziert (4).

Pathogene, die in großen Mengen in Vesikeln von Makrophagen und dendritischen Zellen vorkommen, rufen bei naiven T-Zellen eine Differenzierung zu  $T_H1$ -Zellen hervor. Außerdem ist für die Differenzierung zu  $T_H1$ -Zellen das Zytokin IL-12 erforderlich. Die bioaktive Form IL-12 p70 wird von Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet (5-7) und setzt sich aus den Untereinheiten IL-12 p40 und IL-12 p35 zusammen. Induziert wird die Produktion von IL-12 durch Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (8;9). Der Rezeptor für LPS ist das Oberflächenmolekül CD14 (10) sowie der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4). TLR4 gehört zur Familie der Toll-Rezeptoren, die Pathogene anscheinend nicht direkt erkennen können, aber an der Weitergabe der Signale beteiligt sind (11;12). Aber auch  $IFN-\gamma$ , das von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) produziert wird, ist wichtig für die Entwicklung einer  $T_H1$ -Immunantwort, unter anderem auch, weil es die Produktion von  $T_H2$ -Zellen unterdrückt. Nach Aktivierung der  $T_H1$ -Zellen sezernieren diese Zytokine wie z. B.  $IFN-\gamma$ , das wiederum Makrophagen aktiviert, die dann wieder IL-12 bilden. So wird die Abwehrreaktion gegen das Antigen verstärkt. Des Weiteren induzieren sie in B-Zellen die Produktion der Antikörperisotypen IgG2a. IgG-Moleküle opsonieren Pathogene und machen sie so bereit für die Phagozytose durch Makrophagen.



**Abb. 1.1** Das  $T_H1/T_H2$ -Gleichgewicht

Intrazelluläre Krankheitserreger regen dendritische Zellen und NK-Zellen zur Produktion von IL-12 und IFN- $\gamma$  an, die eine Entwicklung von  $T_H1$ -Zellen auslösen. Diese produzieren dann IL-2 und IFN- $\gamma$  und aktivieren B-Zellen zur Produktion von IgG-Molekülen. IL-4 kann diese Reaktion unterbinden. Es wird von NK1.1<sup>+</sup>-T-Zellen als Reaktion auf extrazelluläre Erreger gebildet und stimuliert die Bildung von  $T_H2$ -Zellen, die daraufhin IL-4, IL-13 und IL-5 sezernieren und B-Zellen so zur Produktion von IgE-Molekülen aktivieren. IL-4 und IFN- $\gamma$  können sich gegenseitig hemmen.

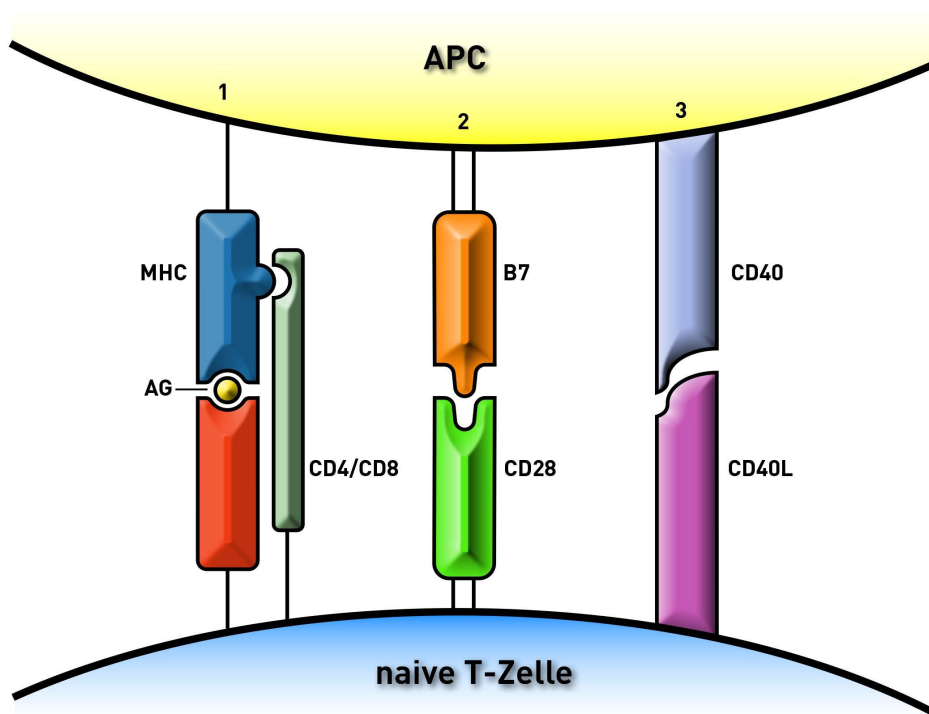
Extrazelluläre Antigene dagegen stimulieren in Gegenwart von IL-4 und IL-6 die Bildung von  $T_H2$ -Zellen. Das IL-4 stammt aus einer spezialisierten Untergruppe der

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die den NK1.1-Marker exprimieren. Diese sezernieren nach Aktivierung große Mengen an IL-4 und beschleunigen so die Entwicklung der T<sub>H</sub>2-Zellen, was bei den anschließenden humoralen Reaktionen des Immunsystems die Bildung von IgE-Molekülen fördert. Nach Stimulation sind die T<sub>H</sub>2-Zellen auf die Aktivierung von antikörperproduzierenden B-Zellen spezialisiert und sezernieren die B-Zell-Wachstumsfaktoren IL-4, IL-6 und IL-13, dadurch lösen sie in B-Zellen die Sekretion von Antikörpern der Klasse IgM aus. Werden B-Zellen zusätzlich über das auf aktivierten T-Zellen exprimierte Molekül CD40L aktiviert, findet ein Wechsel zu einer Produktion von IgA- und IgE-Molekülen statt (13;14). Außerdem sezernieren die T<sub>H</sub>2-Zellen das Zytokin IL-10, das die Makrophagenaktivierung blockiert. IL-10 wird aber auch von T<sub>H</sub>1-Zellen produziert. Es spielt eine regulatorische Rolle bei der Immunantwort (15). Die Zytokine, die von den T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen ausgeschüttet werden, hemmen jeweils die andere Untergruppe. Aufgrund dieser Hemmung kann jeweils eine der beiden Immunantworten dominieren (16;17) (siehe Abbildung 1.1) Bei Atopikern ist das T<sub>H</sub>1-T<sub>H</sub>2-Gleichgewicht zugunsten einer T<sub>H</sub>2-dominierten Antwort verschoben.

Die potentesten antigenpräsentierenden Zellen um naive T-Zellen zu aktivieren, sind die dendritischen Zellen. Sie haben ihren Namen von den charakteristischen Fortsätzen, die den Dendriten der Nervenzellen ähneln (18;19). Sie befinden sich im peripheren Gewebe und ihre bisher einzig bekannte Aufgabe ist es, Antigene mittels Phagozytose und Pinozytose aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren (20-22). Nachdem sie ein Antigen aufgenommen haben, wandern sie in den benachbarten Lymphknoten und reifen dort aus. Als reife dendritische Zellen haben sie nicht mehr die Fähigkeit, Antigene aufzunehmen, stattdessen exprimieren sie eine große Menge an kostimulatorischen Molekülen, MHC-Klasse-I und -Klasse-II, sowie von Adhäsionsmolekülen, die für die Aktivierung von T-Zellen erforderlich sind (23;24). Wichtig bei der Bindung der T-Zellen an antigenpräsentierende Zellen sind die Adhäsionsmoleküle, die diese Bindungen steuern.

Die kostimulatorischen Moleküle sind erforderlich, da naive T-Zellen zu ihrer Aktivierung und Differenzierung zu bewaffneten Effektorzellen neben der Erkennung des Antigens über den MHC-Komplex und die CD4- oder CD8-Rezeptoren noch ein

zweites Signal benötigen. Findet diese Kostimulation nicht statt, wird die T-Zelle inaktiv und kann selbst nach späterer Präsentation eines Antigens nicht mehr aktiviert werden. Man bezeichnet diesen Zustand als Anergie. Solche Kostimulatoren sind die Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die ausschließlich auf Zellen exprimiert werden, die T-Zellen aktivieren können. Der Rezeptor für die B7-Moleküle auf T-Zellen ist CD28. Nach Bindung von B7 an CD28 proliferiert die T-Zelle. Anschließend exprimiert sie den CD40-Liganden (CD40-L), der an CD40 auf antigenpräsentierenden Zellen bindet. Diese Bindung aktiviert die T-Zelle weiter und veranlasst die antigenpräsentierende Zellen zur weiteren Expression von B7-Molekülen, die wiederum die T-Zellen zur Proliferation anregen (Abb. 1.2)



**Abb. 1.2** Expression und Wechselwirkungen der kostimulatorischen Moleküle auf APCs und T-Zellen

Mit CD28 verwandt ist das Molekül CTLA-4, das jedoch als Inhibitor fungiert. Bindet CTLA-4 an die B7-Moleküle werden die T-Zellen weniger empfindlich für eine

Stimulation durch antigenpräsentierende Zellen und die Bildung von IL-2 wird geringer. Ebenfalls mit CD28 verwandt ist das Molekül ICOS, das an den ICOS-Liganden auf antigenpräsentierenden Zellen bindet. Diese Bindung induziert aber im Gegensatz zu der CD28-B7-Bindung nicht IL-2 sondern IL-10. Die genaue Bedeutung von ICOS für das Immunsystem ist jedoch noch nicht bekannt (25). Der Kostimulus B7.2 (CD86) wird bei Atopikern im Vergleich zu Nicht-Atopikern unterschiedlich stark exprimiert. Atopische Patienten mit Asthma exprimieren signifikant mehr B7.2 (CD86) als Nicht-Atopiker, die Expression des Moleküls B7.1 (CD80) ist aber gleich stark bei beiden Gruppen (26-28).

Die dendritischen Zellen in der Haut sind die Langerhans-Zellen. Sie nehmen dort die Antigene auf und wandern dann ebenfalls in die Lymphknoten, wo sie zu reifen dendritischen Zellen differenzieren. Haben antigenpräsentierende Zellen T-Zellen aktiviert, produzieren diese das Zytokin IL-2, das ihr eigener Wachstumsfaktor ist. IL-2 steuert die Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen. Als Effektorzellen benötigen sie keine kostimulatorischen Signale mehr, sie können gleich auf einen bekannten Krankheitserreger reagieren und dadurch eine erneute Infektion verhindern.

### **3. Allergien**

In den letzten Jahrzehnten hat die Häufigkeit von Allergien stark zugenommen. Fast 500 Millionen Menschen leiden heutzutage unter einer Allergie (29). Clemens von Pirquet definierte einst die Allergie als „eine veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine Fremdsubstanz zu reagieren“ (30). Diese Definition schließt aber alle Immunreaktionen ein und ist daher zu allgemein. Heute werden Allergien als „Krankheit, die durch eine Immunreaktion gegenüber einem sonst harmlosen Antigen ausgelöst wird“ beschrieben (31). Die Allergie gehört zu einer Klasse der Immunreaktionen, die man als Hypersensibilität oder Überempfindlichkeit bezeichnet. Coombs und Gell haben diese Überempfindlichkeitsreaktionen in vier Gruppen eingeteilt (32) (siehe Tabelle 1.1).

Hypersensibilitätsreaktionen vom Typ I sind durch IgE-Moleküle vermittelt und finden statt, wenn ein Allergen mit an Mastzellen oder Basophilen gebundenem IgE reagiert.

Dabei degranulieren diese und setzen chemische Mediatoren frei. Symptome treten nach

	Immunkomponente	Antigen	Effektormechanismus	Beispiele
Typ I	IgE-vermittelte Reaktion	lösliches Antigen	Mastzellaktivierung	allergische Rhinitis, allergisches Asthma
Typ II	zytotoxische Reaktion, IgG-vermittelt	zell- oder matrix-assoziiertes Antigen	Phagozyten, NK-Zellen	Zytopenie, einige Medikamentenallergien
Typ III	Immunkomplexreaktion, IgG-vermittelt	lösliches Antigen	Phagozyten, Komplementsystem	Serumkrankheit, Arthus-Reaktion
Typ IV	zelluläre Immunreaktion, T <sub>H</sub> 1-vermittelt	lösliches Antigen	Markophagenaktivierung	Kontaktdermatitis, Tuberkulinreaktion
	zelluläre Immunreaktion, CTL-vermittelt	zellassoziertes Antigen	Cytotoxizität	Kontaktdermatitis

**Tab. 1.1** Einteilung der Hypersensibilitätsreaktionen nach Coombs und Gell

Sekunden auf, aus diesem Grund wird die Typ I-Reaktion auch Sofortreaktion genannt. Allergische Rhinitis, Asthma und systemische Anaphylaxie basieren auf Typ I-Reaktionen.

Typ II-Reaktionen sind zytotoxische Reaktionen, das Antigen ist auf der Zellmembran lokalisiert. Es handelt sich dabei entweder um ein synthetisiertes Molekül (z.B. Blutgruppenantigene) oder um ein Fremdmolekül (z.B. ein Medikament). Durch die Interaktion von zellgebundenem Antigen und zirkulierenden IgG-Molekülen kommt es zu einer Schädigung der Zellmembran. Zellzahlverminderung im peripheren Blut (Zytopenie) und Allergien gegen einige Medikamente sind Beispiele für die Typ II-Reaktion.



Hypersensibilitätsreaktionen vom Typ III sind ebenfalls IgG vermittelt, richten sich aber gegen lösliche Antigene. Ursache der Symptome ist die Ablagerung von Immunkomplexen an bestimmten Stellen im Gewebe. Die Immunkomplexe binden an Fc-Rezeptoren auf Mastzellen und anderen Leukozyten was zu einer lokalen Entzündungsreaktion führt. Dabei dringen Flüssigkeit und Zellen ins Gewebe ein, diesen Vorgang bezeichnet man als Arthus-Reaktion.

Typ IV-Reaktionen werden von T-Zellen vermittelt und lassen sich in zwei Klassen einteilen. Bei der ersten Klasse beruht die Gewebeschädigung auf der Aktivierung von Entzündungsreaktionen durch  $T_H1$ -Zellen, die hauptsächlich durch Makrophagen vermittelt werden. Diese wirken prinzipiell auf die gleiche Weise wie die Immunantwort gegen infektiöse Erreger. Ein klassisches Beispiel ist der Tuberkulintest. Bei der zweiten Klasse durchdringen meist chemische Moleküle die Zellmembran, die im endoplasmatischen Reticulum in Peptide zerlegt werden und von MHC-Klasse I-Molekülen  $CD8^+$ -T-Zellen präsentiert werden. Dabei kommt es zu einer Kontaktallergie. Typ IV-Reaktionen sind Hypersensibilitätsreaktionen vom verzögerten Typ, bei denen die Immunreaktion erst nach 24 bis 72 Stunden stattfindet

Eine entscheidende Frage ist, wie sich Allergien so stark verbreiten konnten, wenn sie doch eine Immunreaktion auf ein harmloses Antigen ist. Untersuchungen zeigten, dass gewisse Begleiterscheinungen der Allergie, wie z.B. die Produktion von IgE auch dann vorkommen, wenn das Immunsystem Parasiten bekämpft. In nicht industrialisierten Ländern, in denen die Menschen noch mit Parasiten in Berührung kommen, gibt es fast keine Allergien. Die Fähigkeit IgE zu produzieren und so Parasiten zu bekämpfen stellt einen Überlebensvorteil dar. Es gibt eine genetische Prädisposition, die in einer verstärkten IgE-Produktion resultiert. In den Industrienationen hat dies zur Folge, dass sich die Anlage, allergisch zu reagieren, weitervererbt, die Betroffenen werden als Atopiker bezeichnet. Bei Atopikern findet man einen höheren Spiegel an Eosinophilen im Blut und einen höheren Gesamtspiegel von IgE. Es konnten zwei Genloci auf den Chromosomen 11q und 5q ermittelt werden, die bei der Veranlagung der Atopie von Bedeutung zu sein scheinen (33).

Unterschiedliche Allergene rufen, je nach Berührungsstelle im Körper, unterschiedliche Reaktionen hervor. So erzeugt ein Allergen, das mit den oberen Atemwegen in Kontakt kommt eine verstopfte oder triefende Nase, eine allergische Rhinitis. Sind die unteren Atemwege betroffen, kommt es zu asthmatischen Symptomen wie der Verengung der Bronchien. Entsprechend rufen Immunreaktionen in den Geweben des Magen-Darm-Traktes Übelkeit, Durchfall und Erbrechen hervor. Gelangt ein Allergen in die Blutbahn kommt es zu lebensbedrohlichen Reaktionen, dem anaphylaktischen Schock.

#### **4. Allergene**

Als Allergene werden Substanzen bezeichnet, die allergische Reaktionen hervorrufen. Sie sind meistens wasserlösliche Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 bis 50 Kilodalton und werden häufig mit getrockneten Partikeln inhaliert, die sich dann in der Schleimhaut (Mucosa) von diesen Partikeln, aufgrund ihrer guten Löslichkeit ablösen. Sie werden nur in geringen Mengen (10-100 ng pro Tag) aufgenommen (34;35). Einige der Allergene sind hochallergen und rufen bei den meisten Patienten eine IgE-Reaktion hervor, sie sind somit Hauptallergene, andere sensibilisieren nur wenige Patienten und werden als Nebenallergene bezeichnet. Zu der Gruppe der Hauptallergenen gehören zum Beispiel die Pollen des Lieschgrases (*Phleum pratense*).

Was ein Allergen zu einem Allergen macht, ist noch nicht bekannt. Es wurde aber festgestellt, dass das Hauptallergen der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssimus* aus einer Cysteinprotease besteht, die ein Bestandteil der tight junctions zwischen den Zellen spalten kann und so die Epithelbarrieren überwinden kann. Dies könnte eine mögliche Ursache für die Allergenität bestimmter Enzyme sein (36). Proteolytische Aktivitäten bestimmter Allergene gegenüber Rezeptoren auf B- und T-Zellen können die Allergenität außerdem steigern, da ein Verlust der Rezeptoraktivität das Gleichgewicht zwischen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen stören kann.

#### **5. Sensibilisierungs- und Auslösephase der Allergie**

Auch wenn Allergene unterschiedliche Symptome hervorrufen, die Prozesse, die im Körper stattfinden, sind die gleichen. Am Anfang steht die Sensibilisierung, dabei

werden noch keine Symptome ausgelöst, sondern der Organismus wird darauf vorbereitet, bei erneutem Kontakt sofort zu reagieren. Die Sensibilisierung beginnt damit, dass Makrophagen das Allergen phagozytieren, prozessieren und den T-Zellen präsentieren. Diese setzen dann IL-4 frei, was die B-Zellen zu Plasmazellen ausreifen lässt, die dann IgE produzieren (37;38). Dieses heftet sich an Rezeptoren auf Mastzellen im Gewebe, sowie auf Basophilen im Blutstrom. Bei erneutem Kontakt mit dem Allergen kommt es dann zur Auslösephase mit der Aktivierung von Mastzellen (39;40). An allergischen Reaktionen sind vier Komponenten beteiligt, sie bilden die Grundlage bei allen Typ I-Allergien. Es handelt sich um das Allergen, IgE-Antikörper, Mastzellen und Mediatoren. Mastzellen sind im Gewebe des Körpers zu finden, hauptsächlich im Schleimhaut- und Epithelgewebe. Sie exprimieren dauerhaft den Rezeptor FcεRI auf ihrer Oberfläche und werden aktiviert, wenn Antigene an IgE binden, das wiederum an den Rezeptor gebunden ist (41). Dadurch werden die Rezeptoren kreuzvernetzt und die Mastzellen aktiviert. Nach ihrer Aktivierung setzen sie innerhalb von Sekunden bereits vorgefertigte Mediatoren aus ihren Granula frei, die basophile und eosinophile Zellen an den Eintrittsort des Allergens locken. Diese Zellen verstärken dann die allergische Reaktion (42). Eosinophile haben Granula mit argininreichen, basischen Proteinen, die sich durch den Farbstoff Eosin anfärben lassen, daher stammt auch der Name Eosinophile. Diese Zellen befinden sich meist im Bindegewebe unter den Epithelien des Urogenitaltraktes, der Atemwege und des Darms. Nach ihrer Aktivierung schütten sie die Granula aus und setzen toxische Proteine und Radikale frei. Diese wehren eigentlich eine Parasiteninfektion ab, da bei allergischen Erkrankungen keine Parasiten im Organismus vorkommen, richten sie große Schäden im Gewebe an. Außerdem schütten sie nach ihrer Aktivierung Prostaglandine, Leukotriene und Zytokine aus, die weitere Eosinophile und Leukozyten anlocken und so die Entzündungsreaktion verstärken (43). Deshalb wird die Aktivierung und Degranulierung der Eosinophilen stark kontrolliert. Ohne eine vorliegende Infektion werden wenige Eosinophile gebildet, erst durch das Zytokin IL-5, das von T<sub>H</sub>2-Zellen gebildet wird, wird die Bildung der Eosinophilen angeregt. Die Wanderung der eosinophilen Zellen vom Blut ins Gewebe wird durch Chemokine reguliert. Typisch für chronische allergische Reaktionen ist das Vorkommen von Eosinophilen, die dann eine Gewebeschädigung verursachen. Man spricht von einer Eosinophilie, wenn sich große Mengen dieser Zellen im Blut oder im

Gewebe angesammelt haben. Die basophilen Zellen haben ähnliche Funktionen wie die Eosinophilen und ihre Bildung wird ebenfalls durch das Zytokin IL-5 induziert (44-46). Hohe IgE-Konzentrationen können zu einer starken Zunahme des FcεRI-Rezeptors führen, was wiederum zu einer verstärkten Empfindlichkeit gegenüber dem Allergen führt. Nach der Aktivierung setzen Mastzellen Chemokine, Leukotriene und andere Lipidmediatoren, aber auch Zytokine wie IL-4 und IL-13 frei, welche die T<sub>H</sub>2-Immunreaktion aufrechterhalten. Die Lipidmediatoren wirken sehr schnell und haben zur Folge, dass sich die Permeabilität der Gefäße erhöht, die glatte Muskulatur kontrahiert und vermehrt Schleim freigesetzt wird (47).

Allergische Reaktionen können in zwei Phasen eingeteilt werden. In die Sofortreaktion, die innerhalb von Sekunden geschieht und in die Spätreaktion, die nach acht bis zwölf Stunden eintritt. Die Sofortreaktion ist durch die Aktivität von Histamin, das von Mastzellen sezerniert wird, und anderen vorgefertigten Mediatoren wie Prostaglandinen definiert. Histamin ist ein vasoaktives Amin, das die Gefäßpermeabilität und die Durchblutung erhöht. Die Spätreaktion ist beherrscht von Leukotrienen, Chemokinen und Zytokinen. Diese bewirken, dass weitere T<sub>H</sub>2-Zellen angelockt werden. Es kann hierbei zu chronischen Leiden, wie Asthma kommen, wenn das Allergen dem Immunsystem weiter präsent bleibt. Die Spätreaktion ist definiert durch die Synthese von Leukotrienen, Chemokinen und Zytokinen, die durch aktivierte Mastzellen induziert werden. Dadurch werden weitere Eosinophile und T<sub>H</sub>2-Zellen an den Entzündungsherd gelockt, es kommt zu einer zweiten Phase der Kontraktion der glatten Muskulatur und zur Bildung von Ödemen (48-50).

## **6. Therapien**

Lange Zeit wurden allergische Erkrankungen als nicht wirklich gefährlich eingestuft und als Krankheiten die mit pharmazeutischen Mitteln sehr gut in den Griff zu bekommen sind. Mittlerweile aber wurde erkannt, dass allergische Erkrankungen durchaus ein Gefahrenpotential darstellen, das tödlich enden kann. Deshalb und wegen der enorm ansteigenden Zahl von Allergikern ist es notwendig, neue Therapieformen zu entwickeln. Die gängigste Behandlung von allergischen Symptomen ist die Gabe von Medikamenten, die den Histaminrezeptor H1 blockieren und somit die Aktivierung der

Mastzellen und Eosinophilen verhindern. Da dabei aber, wie bereits erwähnt, nur die Symptome, nicht aber die Ursache der Allergie bekämpft wird, sind Alternativen zu dieser Art der Behandlung gesucht.

Bislang werden zwei Therapien bei allergischen Erkrankungen angewendet, die Hyposensibilisierung oder auch spezifische Immuntherapie (SIT) genannt und die Blockade der Effektorwege. Bei der Hyposensibilisierung, die erstmals von Freeman und Noon beschrieben wurde, wird das entsprechende Allergen, auf das die Patienten allergisch reagieren, in immer höher werdenden Dosen injiziert (51). Dabei verschiebt sich die Immunantwort von einer  $T_H2$ -dominierten zu einer  $T_H1$ -dominierten Antwort mit einhergehenden Reduktion des IgE-Titers (52-54). Weiterhin wurde eine reduzierte Proliferation der T-Zellen auf das Allergen und die Bildung des regulatorischen Zytokins IL-10 beobachtet (53). Die SIT ist weit verbreitet, hat aber durchaus Nachteile, wie die Gefahr eines anaphylaktischen Schocks, da es auch während der Hyposensibilisierung zur Degranulation der Mastzellen kommt, und die Länge der Behandlung, die sich über Jahre hinweg zieht (55).

Aus diesem Grund werden Alternativen dazu gesucht. Eine davon ist die Vakzinierung mit Peptiden, die aus den Allergenen stammen. Diese Art der Impfung ruft eine Anergie der T-Zellen hervor, einhergehend mit Veränderungen im T-Zellphänotyp, des Zytokinmusters und der Herunterregulierung des T-Zell-Rezeptorkomplexes. Dadurch, dass bei dieser Methode nicht das komplette Antigen den B-Zellen präsentiert wird, wird auch kein IgE produziert, da B-Zellen nur in der Lage sind intakte Antigene zu erkennen und die entsprechenden Antikörper zu produzieren. Das Problem dieser Methode ist aber, dass die individuelle Immunantwort auf Peptide abhängig ist vom MHC-Klasse II-Komplex und jedes Individuum andere Allele dieses Moleküls hat, so dass jeder auf andere Peptide, die aus Allergenen hergestellt sind, reagiert. Daher müsste die Anzahl der Peptide, die bei dieser Impfung eingesetzt werden, enorm hoch sein.

Eine andere Strategie ist die Impfung mit CpG-Motiven. CpG-Motive sind reich an unmethylierten Cytosin-Guanin-Dinukleotiden und dienen als Adjuvantien, die in der Lage sind, die Immunogenität von Antigenen zu verstärken. Es ist bekannt, dass diese CpG-Motive aus bakteriellen DNA-Sequenzen einen stark aktivierenden Effekt auf

APCs, speziell auf dendritische Zellen haben und eine  $T_H1$ -dominierte Immunantwort verstärken. Dendritische Zellen antworten auf CpG-Motive mit einer verstärkten Sekretion von  $TNF-\alpha$ , IL-6 und IL-12, was eine  $T_H1$ -dominierte Immunantwort induziert (56). Der Effekt der CpG-Motive *in vivo* variiert je nach Beschaffenheit des Antigens, den Bedingungen der Vakzinierung und der Spezies. Es wurde z.B. bei einer Koinjektion von  $\beta$ -Galaktosidase mit CpG-Motiven einen eindeutigen immunmodulatorischen Effekt in Mäusen nicht aber bei Injektion von *Phl p 2* oder *Bet v1a* beobachtet (57).

Eine weitere Methode, zur Eindämmung der allergischen Reaktion ist die Blockade des hochaffinen IgE-Rezeptors auf Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen durch Kompetitoren des Rezeptors. Auch die Blockade des freien IgE direkt durch einen monoklonalen Antikörper ist möglich (58).

Eine Alternative zur SIT, die aber auch die allergische Immunantwort auf T-Zellebene beeinflusst, könnte durch die Vorbehandlung der antigenpräsentierenden Zellen, die dann die T-Zellantwort verändern, erreicht werden. Durch die Transfektion der antigenpräsentierenden Zelle mit der DNA eines Antigens und der daher anderen Präsentation des Antigens könnte die Immunantwort der T-Zellen verschoben werden. Als antigenpräsentierende Zelle eignet sich hier die dendritische Zelle besonders gut, da sie, wie bereits erwähnt, die potenteste der antigenpräsentierenden Zellen ist und sogar naive T-Zellen aktivieren kann (59). Außerdem lassen sich dendritische Zellen sehr gut und in großer Anzahl aus peripherem Blut mit Hilfe von IL-4 und GM-CSF gewinnen. IL-4 inhibiert die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen. Nach sechs Tagen findet man in dieser Kultur unreife dendritische Zellen, die nach Zugabe der proinflammatorischen Zytokine  $PGE_2$ ,  $TNF-\alpha$  und IL- $1\beta$  ausreifen (60). *Spiegelberg et al.* konnten zeigen, dass Allergen-DNA-Vakzine in Mäusen die allergische Immunantwort sehr effektiv verschieben können, von einer  $T_H2$ - zu einer  $T_H1$ -dominierten Antwort (61). In anderen Mausstudien wurde gezeigt, dass die Transfektion von dendritischen Zellen mit dem Tumorpeptid TRP2 mittels Adenovirus eine stärkere Antwort auf den Tumor induziert (62). Dies bewirkt, dass die Mäuse den Tumor besser abstoßen können. Außerdem konnten *Sudowe et al.* zeigen, dass die Vakzinierung von Mäusen mit einem replikationsdefekten Adenovirus, der für das Gen  $\beta$ -Galaktosidase

kodiert, eine spezifische IgE-Antwort verhindert mit einem Shift von einer T<sub>H</sub>2- zu einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort (63).

### **7. Adenoviren**

Da durch Transfektionsmethoden wie Lipofektion oder Elektroporation dendritische Zellen nur in sehr geringem Masse zu transfizieren sind, wurde nach anderen Transfektionsmethoden gesucht. Durch den Einsatz eines replikationsdefizienten Adenovirus, lassen sich dendritische Zellen jedoch sehr effizient transfizieren (64).

Das Virus hat einen Durchmesser von 80 – 100 nm und ist ein Capsid ohne Membranhülle. Es hat eine doppelsträngige, lineare DNA, die 36000 – 38000 Basenpaare groß ist. Das Genom des Virus besteht aus fünf kodierenden Bereichen, von denen vier (E1 – E4) früh während der Infektion aktiviert werden. Der fünfte Bereich ist eine Gruppe von spät exprimierten Genen, die L-Gene, die für die Synthese der viralen Strukturproteine verantwortlich sind. Die Region E1 wirkt im viralen Infektionszyklus transaktivierend und induziert die Transfektion der E2-, E3- und E4-Gene. Die E2-Gene sind verantwortlich für die Replikation der viralen DNA und die E3-Gene für die Etablierung einer persistierenden Adenovirusinfektion, während die E4-Region des Genoms für den Infektionszyklus und die Genomreplikation kodiert. Das Adenovirus, welches für die Transfektion von dendritischen Zellen eingesetzt wird, ist in der E1- und E4-Region deletiert. Dadurch ist der replikative Zyklus unterbrochen. Die Rekombination des Adenovirus (pAdEasy-1) mit einem Shuttlevektor, der eine Allergen-DNA enthält, wird in eukaryotischen Zellen durchgeführt. So enthält man ein Konstrukt, das sowohl die adenoviralen Sequenzen, als auch die des „gene of interests“ beinhaltet, mit diesem Konstrukt werden sogenannte „packaging cells“ transfiziert, welche die deletierte E1-Region komplementieren und so eine Replikation des Adenovirus ermöglichen. Aus diesen Zellen wird das Virus dann mittels einer CsCl-Dichtezentrifugation aufgereinigt und kann nun eingesetzt werden, um andere Zellen zu infizieren (65;66).

### **8. Zielsetzung der Arbeit**

Eine Typ I-Allergie ist bestimmt durch die Dominanz einer  $T_H2$ -dominierten humoralen Immunantwort und die Produktion des Antikörperisotyps IgE. Bislang eingesetzte Therapien, außer der SIT, behandeln nur die Symptome der allergischen Erkrankung, nicht aber deren Ursachen. Therapien, die den Ursachen einer Allergie entgegenwirken müssten das Gleichgewicht von einer  $T_H2$ -Dominanz zu einer  $T_H1$ -Immunantwort verschieben.

Bisher gelingt das nur der spezifischen Immuntherapie, die aber sehr lange dauert und außerdem gefährliche Nebenwirkungen haben kann, wie z.B. einen anaphylaktischen Schock. Daher wird nach Alternativen gesucht.

Eine Alternative wäre der Einsatz von dendritischen Zellen, die mit Allergen-DNA transfiziert sind, womit sich die vorliegende Arbeit beschäftigt hat. Der Vorteil das gesamte Gen in dendritische Zellen einzuschleusen anstelle eines Peptids ist die zusätzliche Präsentation durch den MHC-Klasse-I-Komplex und die Aktivierung der  $CD8^+$ -T-Zellen (67). Desweiteren produzieren dendritische Zellen nach Aktivierung durch LPS und CD40L selbst das  $T_H1$ -induzierende Zytokin IL-12 (8;68-70), wodurch die IgE-Antwort ebenfalls gehemmt werden könnte. Durch die Präsentation des Allergens von dendritischen Zellen ist eine Aktivierung von Mastzellen und deren Folgen, wie Histaminfreisetzung und IgE-Produktion nicht möglich, da das Allergen nicht mehr frei ist, sondern gebunden und in Peptide zerlegt ist und so nicht mehr an den  $Fc\epsilon R$  binden kann.

Zur Klärung der Fragestellung, ob durch den Einsatz von dendritischen Zellen, die mit Allergen-DNA transfiziert waren, eine Verschiebung der  $T_H2$ -Antwort zugunsten einer  $T_H1$ -dominierten Immunantwort erreicht werden kann, wurden dendritische Zellen mit Hilfe der effektivsten Transfektionsmethode, einem Adenovirus, der für das Allergen des Lieschgraspollens *Phl p1* kodiert, transfiziert und mit autologen  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Zellen kokultiviert. Mit diesen Kokulturen wurde die Proliferation der eingesetzten T-Zellen untersucht, im Hinblick auf die unterschiedlich behandelten dendritischen Zellen. Desweiteren wurden von den Kokulturen Überstände abgenommen und die produzierten Zytokine im ELISA untersucht.



## II. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Laborgeräte

Beta-Counter: Wallac Liquid Scintillation Counter 1205, LKB Wallac, Turku, Finnland

Brutschränke: Zellkultur: B 5061 EK/CO<sub>2</sub>, Heraeus, Hanau

Bakterien: Incucell, MM Medcenter

Dispenser: Multipette 4780, Eppendorf, Hamburg

Durchflußzytometer: FACScan und FACSCalibur, Becton Dickinson, CA, USA

Elektrische Pipettierhilfe: Pipetus, Hirschmann, Eberstadt

Elektrophoresegerät: Power Pac 1000, Bio-Rad, München

Elektrophoresekammer: Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis, Bio-Rad

ELISA-Reader: Modell 450, Bio-Rad

Fluoreszenzmikroskop: Zeiss, Axiovert S100

Lichtmikroskop: DM IL, Leica

CH-2, Olympus, Hamburg

Magnetrührer: IKAMAG RCT, Janke & Kunkel, Staufen

Magnetständer für MACS-Säulen, Miltenyi, Bergisch Gladbach

Inkubator für Bakterien: Certomat U und Certomat H, Braun, Melsungen

pH-Meter: Mikroprozessor pH 539, WTW, Weilheim

Photometer: Bio Photometer 6131, Eppendorf Scientific, Westbury, NY, USA

Pipettierhilfe: Pipetman, Gilson, F 95400 Villiers-le-Bel, Frankreich

Finnpipette, zwölfkanal, Labsystems

Sterilbank: Lamin-Air, HB 2472, Heraeus

Transfektionsgeräte: Rechteckimpulsgenerator, Dr. L. Fischer, Heidelberg

Waagen: Multifunktionswaage Baureihe HG, Roth, Karlsruhe

MCI Analytic AC 210 S, Sartorius, Göttingen

Wasserbäder: GFL, Schommartz-Labortechnik, Worms

5 BU & Thermomix BU, B. Braun

Zählkammer (Neubauer): Kühn & Bayer, Nidderau

Zellerntegerät: Skatron AS, Skatron, Norwegen

Zentrifugen: Minifuge RF, Heraeus

Megafuge 1.0, Heraeus

Suprafuge 22, Heraeus

Centrifuge 5415 C, Eppendorf

Biofuge fresco, Heraeus

### 1.2 Software

Auswertung und Statistik: Microsoft Office XP, Microsoft, USA

ELISA: Microplatemanager 4.0, Bio-Rad

Immunfluoreszenz: CellQuest II, Becton Dickinson

Graphiken: Macromedia Freehand MX

Fluoreszenzmikroskop: Metamorph, Universal Imaging

### 1.3 Verwendete Gebrauchsartikel

Tab. 2.1 Verwendete Gebrauchsartikel

Artikel	Art	Firma
Combitips	12.5 ml, 2.5 ml, 0.5 ml	Eppendorf
Deckgläser	15 x 15 mm	Menzel Gläser
Dialyseschläuche	Nadir-Dialyseschläuche, 42 mm, 25-30 ?	Carl Roth, Karlsruhe
Einschweißfolie	10 x 200 mm	VP Papier
Einwegspritzen	1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	B. Braun
Elektroporationsküvetten	Gene Pulser, 0.4 und 0.2	Bio-Rad
ELISA-Platte	96-well, Maxisorp	Nunc, Wiesbaden
Filme	667 Hyperfilm-ECL	Amersham, Braunschweig
Kanülen	0.8 x 40 mm, 0.45 x 12 mm,	B. Braun

	0.7 x 30 mm	
Kryoröhrchen	1.8 ml	Nunc
MACS Separation Columns	MS und LS	Miltenyi
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel Gläser
Pasteurpipetten		Brand
Petrischalen	Ø 10 cm, unbeschichtet und TC-beschichtet	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	10µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner
PVDF-Membran		Millipore
Reaktionsgefäße	0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml	Sarstedt
Rundbodenröhrchen	2.4 / 75 mm	Becton Dickinson
Separationssäulen	MACS Separation Columns LS und MS	Milteniy Biotec, Bergisch Gladbach
Sterilfilter	0.2 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturflaschen	25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup>	TTP, Vitromex, Vilshofen
Zellkulturplatten	6-, 12-, 24-, 48- und 96-well Flachboden	Costar
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml, 14 ml	Greiner, Herolab

### 1.4 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 2.2 Chemikalien und Reagenzien

Artikel	Firma
<sup>3</sup> [H]-Thymidin	ICN, Eschwege
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

2,2-Azino-bis(3-ethylenbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)	Sigma-Aldrich
Acrylamid 30%	Roth, Karlsruhe
Agarose (Bakterienkultur)	Gibco BRL, Berlin
Agarose (Gelelektrophorese)	Bio-Rad
Ampicillin	Roth
Aprotinin	Bayer, Leverkusen
Aqua bidest	Apotheke der Uniklinik Mainz
Aqua bidest, steril	B. Braun
BCA Reagenz	Pierce, Rockford, Illinois, USA
Bluestain (Western-Blot)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Buffy-Coats	Transfusionszentrale, Mainz
Cäsium Chlorid	Eurobio, Les Ullis Cedex, Frankreich
Citronensäure	Serva, Heidelberg
ECL plus	Amersham, Braunschweig
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden
Essigsäure	Roth
Ethanol 70%	Apotheke der Uniklinik, Mainz
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure-Na <sub>2</sub> (EDTA)	Boehringer, Mannheim
Ficoll 1.077	Biochrom, Berlin
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
Glycerin	Roth
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Gibco BRL
Hepes	Gibco BRL

IMDM	Gibco
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Ladepuffer	Roth
L-Glutamin	Gibco, RRL
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.a.	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Milchpulver	Fremareform, Gesundheitskostwerk, Lüneburg
Natriumacetat	Serva
Natriumazid	Serva
Natriumchlorid, p.a.	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogencarbonat, p.a.	Merck
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, reinst	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich
Penicillin	Serva
Pepton	Gibco BRL
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Boehringer
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Rotiblock	Roth
Roti-Blot A (Anodenpuffer)	Roth
Roti-Blot K (Kathodenpuffer)	Roth
Rotiphoresegel 30	Roth
RPMI-1640	Gibco BRL

Saccharose	Roth
Salzsäure 1N	Merck
SDS Ultrapure	Roth
Streptavidin (Peroxidase-gekoppelt)	Zymed, CA, USA
Streptomycin	Serva
Szintillationsflüssigkeit rotiszint eco	Roth
TRIS-Base	Roth
TRIS-HCL	Roth
Triton X100	Sigma-Aldrich
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Versen 1:5000	Gibco
Wasserstoffperoxid 30%	Apotheke der Uniklinik, Mainz

### 1.5 Antikörper

Die in Tabelle 2.3 aufgeführten monoklonalen Antikörper wurden für die Durchflußzytometrie, die Depletion und Zellkultur von Zellpopulationen verwendet.

**Tab. 2.3** Antikörper für die Durchflußzytometrie, Zelldepletion und Zellkultur

Antikörper	Spezifität	Klasse	Bezugsquelle	Referenz
RPA-T4	CD4-FITC	Maus IgG1	Pharmingen	(71)
RPA-T8	CD8-FITC	Maus IgG1	Pharmingen	(71)
3C10	CD14	Maus IgG2b	ATCC	(72)
HIB19	CD19	Maus IgG1	PharMingen	(73)
B-B20	CD40	Maus IgG1	Camon	(74)
MAB104	CD80	Maus IgG1	Immunotech	(75)
HB-15	CD83	Maus IgG2b	Immunotech	(76)
IT2.2	CD86	Maus IgG2b	PharMingen	(77)

YE2/36HLK	HLA-DR	Rat IgG2a	Camon	(78)
G46-6	HLA-DR	Maus IgG2a	Pharmingen	(79)
W6/32	MHC-class-I	Maus IgG2a	Sigma	(80)

Zur Isotypenkontrollen wurden Ratten-Immunglobuline der Subklasse IgG2a und Maus-Immunglobuline der Subklassen IgG1, IgG2a und IgG2b der Firma Pharmingen verwendet.

Für die Sekundärfärbung wurde ein R-Phycoerythrin (PE) gekoppelter Esel- $\alpha$ -Maus IgG (H+L; F(ab')<sub>2</sub>) Antikörper bzw. ein Dichlortriazinyl-Amino-Fluorescein (DTAF) gekoppelter Ziegen- $\alpha$ -Ratte IgG (H+L) Antikörper der Firma Dianova, Hamburg eingesetzt.

Die in Tabelle 2.4 aufgeführten Antikörper wurden im ELISA zur Bestimmung von Zytokinen eingesetzt.

**Tab. 2.4** Antikörper für ELISA

Zytokin	„Capture“-Antikörper	Detektions-Antikörper (biotinyliert)	Antikörper und Standard von Firma
IL-4	8D4-8	MP4-25D2	PharMingen
IL-5	TRFK5	JES1-A10	PharMingen
IL-6	6709.11	BAF 206	R & D Systems
IFN- $\gamma$	NIB42	4S.B3	PharMingen
IL-10	JES3-9D7	FES-12G8	PharMingen
IL-12p40	C8.3	C8.6	PharMingen
IL-12p70	G161-566	C6 C8.6	PharMingen

Für die Detektion des *Phl p 1*-Proteins auf dem Western-Blot wurde der Antikörper IG12 (Maus IgG1) verwendet, zur Verfügung gestellt von A. Petersen und W.-M-Becker aus dem Forschungszentrum Borstel. Als Sekundärintikörper wurde ein Ziegen-

$\alpha$ -Maus IgG Antikörper der Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA eingesetzt, der Peroxidase gekoppelt ist.

### **1.6 Puffer und Medien**

#### **1.6.1 Medien für die Zellkultur**

##### RPMI-1640 Medium:

RPMI-1640 Trockenmedium

5 mM 2-Mercaptoethanol

25 mM Hepes

1 mM Natriumpyruvat

2 g/l Natriumhydrogencarbonat (5% CO<sub>2</sub>-Begasung)

in Aqua dest.: pH 7.2, sterilfiltriert

vor Gebrauch zugesetzt:

2mM L-Glutamin

100 µg/ml Streptomycin

100 U/ml Penicillin

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

IMDM Trockenmedium

3.024 g/l NaHCO<sub>3</sub>

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

##### Plasma und Serum:

Zu den Medien wurde bei der Kultur von COS-7 Zellen 10% FCS zugegeben.

Zu der Kultur mit humanen Primärzellen wurde ausschließlich autologes Plasma zugegeben, um eine Kontamination mit Fremdproteinen zu vermeiden.

Die Seren wurde jeweils 30 min bei 56°C inaktiviert.



### **1.6.2 Medien für die Bakterienkultur**

#### LB-Agar:

10 g/l Pepton

5 g/l Hefe

5 g/l NaCl

15 g/l Agar

autoklavieren, danach (bei <math>50^{\circ}\text{C}</math>) Ampicillin (120  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Kanamycin (60  $\mu\text{g/ml}$ ) zugeben

anschließend 20 ml/Platte ausgießen

#### LB-Medium:

10 g/l Pepton

5 g/l Hefe

5 g/l NaCl

autoklavieren

#### SOC-Medium:

20 g/l Pepton

5 g/l Hefe

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM  $\text{MgSO}_4$

10 mM  $\text{MgCl}_2$

autoklavieren, danach Zugabe von (sterilfiltrierter) Glucose 20 mM

### **1.6.3 Puffer**

Alle Puffer wurden, falls nicht anders beschrieben, bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### ABTS-Substrat-Lösung:

0.3 mg/1 ml ABTS

0.1 M Citrat

in Aqua dest., pH 4.35  
vor Gebrauch Zugabe von  
1  $\mu$ l/ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%)  
dann sofort verwenden

### Acetatpuffer:

3 M Natriumacetat  
in Aqua dest.

### Adenoresuspensionspuffer:

50 mM Tris-HCL, pH 7,5  
250 mM NaCl

### Aktiviertes Na-ortho-Vanadat:

200 mM Na-ortho-Vanadat  
in PBS, einstellen auf pH 10  
gelbliche Lösung kochen bis sie farblos wird  
erneut auf pH 10 einstellen  
Vorgang wiederholen, bis die Lösung wieder farblos ist  
bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern

### CsCl-Lösung $\delta = 1,4$ g/ml:

53 g CsCl in 87 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8 lösen

### CsCl-Lösung $\delta = 1,2$ g/ml:

26,8 g CsCl in 92 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8 lösen

### Elektrophorese-Puffer 4x (Western-Blot):

100 mM Tris-HCl  
767 mM Glycin  
13.7 mM SDS  
in Aqua dest., pH 8.5

### FACS-Puffer:

2% (w/v) FCS  
in PBS

### 10% Glycerinlösung:

10 ml autoklaviertes Glycerin  
90 ml steriles Aqua dest.

### Lysepuffer (Western-Blot):

50 mM Hepes  
150 mM NaCl  
1.5 mM  $MgCl_2$   
1 mM EDTA  
10% (v/v) Glycerol  
1% (v/v) Triton X-100  
in Aqua dest.  
vor der Verwendung Zugabe von :  
2 mM PMSF in Ethanol gelöst  
2 mM aktives Na-ortho-Vanadat  
10  $\mu$ g/ml Aprotinin

### Lysepuffer (DNA-Minipräp.):

0.2 M NaOH  
1% (w/v) SDS  
in Aqua dest.

### MACS-Puffer:

2 mmol EDTA  
10% FCS  
in PBS

Neutralisierungspuffer (DNA-Minipräp.)

60 ml 5M Kaliumacetat

11.5 ml Essigsäure

25.5 ml H<sub>2</sub>O

PBS („phosphate buffered saline“) 10 x:

81.8 g/l NaCl

15.6 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

in Aqua dest., pH 6.6, autoklaviert; bei einer 1:10 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O liegt der pH-Wert bei 7.2

3% Saccharoselösung:

150 mM NaCl

10 mM Tris-HCl pH 7,5

1 mM MgCl<sub>2</sub>

3% Saccharose

SET-Lösung:

0.1 M NaCl

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

in Aqua dest.

TPBS (Western-Blot):

0.1 (v/v) Tween-20

in PBS

Trypanblau:

90 ml PBS

10 ml Trypanblau

### Waschpuffer (Western-Blot):

24.2 g TRIS-Base  
80 g NaCl  
in Aqua dest., pH 7.6

### Zytokin-ELISA „blocking”Puffer:

1% (w/v) BSA  
bei 37°C in PBS lösen

### Zytokin-ELISA „coating”Puffer:

0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
in Aqua dest.  
einstellen auf pH 9.0 (für IL-12: pH 6.0) mit 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### **1.7 Allergene**

Es wurde die Gräserpollenallergenmischung der Firma ALK-Scherax, Hamburg eingesetzt und das Allergen *Phleum pratense p 1* freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn PD. Dr. A. Petersen aus dem Forschungszentrum Borstel.

### **1.8 Zytokine**

Für die Zellkultur wurden die rekombinanten Zytokine IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (Strathmann Biotec AG), Prostaglandin-E<sub>2</sub> (UpJohn GmbH, Heppenheim (Minprostin E2)), sowie rekombinantes humanes GM-CSF (Sandoz AG, Nürnberg (Leucomax 300)) eingesetzt.

### **1.9 Plasmide**

Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz und Expressionsrate wurde der Expressionsvektor pEGFP-C der Firma Clontech (CA, USA) verwendet, in dem das Gen für das modifizierte „enhanced green fluorescence protein” (EGFP) inkloniert ist. Das Protein wurde aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert und wird dort durch das emittierte blaue Licht eines zweiten bioluminiszierenden Proteins, dem Aequorin, zu grüner Fluoreszenz angeregt. Das natürliche Protein absorbiert Licht der Wellenlänge

395 nm und emittiert grünes Licht um die 509 nm. Durch den Austausch zweier Aminosäuren erfolgt eine Rotverschiebung der Absorption und Emission und damit eine bessere durchflußzytometrische Nachweisbarkeit. Die erfolgreiche Transfektion und Expression des Plasmids kann durch das grüne Leuchten des Proteins quantifiziert werden. Die Selektion bei der Vermehrung in Bakterien erfolgt über Kanamycin.

Die Expressionsvektoren mit den Genen für die Allergene der Lieschgraspollen (*Phleum pratense*) Phl p 1 (pcDNA1.1/Amp-Phl p 1) wurde uns von A. Petersen und W.-M. Becker aus dem Forschungszentrum Borstel zur Verfügung gestellt. Das Gen wurde in den Vektor pcDNA1.1/Amp der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) einkloniert. Die Selektion bei der Vermehrung in Bakterien erfolgte über Ampicillin.

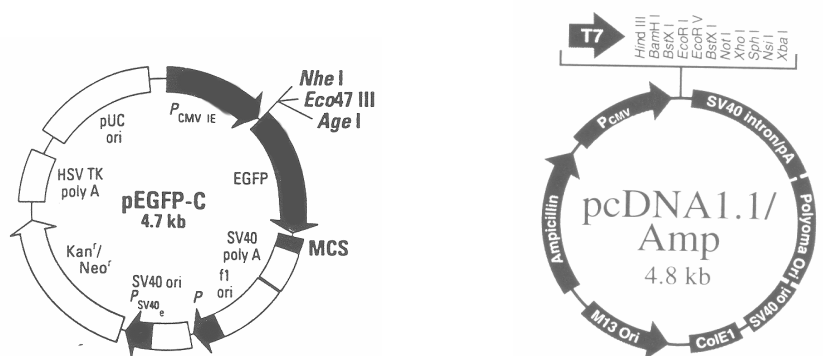


Abb. 2.1 Plasmidkarten der verwendeten Plasmide

## 1.10 Zelllinien

### 1.10.1 293 Zellen

Zur Vermehrung der replikationsdefekten Adenoviren Typ 5 wurden 293 Zellen eingesetzt. Diese 293 Zellen sind humane Nierenzellen, die mit der E1-Region des Adenovirus stabil transfiziert sind und so eine Vermehrung der E1-replikationsdefekten Adenoviren ermöglichen.

### **1.10.2 Cre8-Zellen**

Cre8-Zellen wurden durch stabile Transfektion der 293-Zelllinie mit dem 38 kDa großen Rekombinase-Protein Cre aus dem Bakteriophagen P1 erzeugt. Cre8-Zellen unterstützen die Replikation E1-deletierter Adenoviren und vermitteln die Rekombination zwischen loxP-Seiten des Shuttle-Vektors pAdlox und der  $\Psi$  Virus DNA.

### **1.11 Allergiker**

Das Kriterium für Probanden mit einer Allergie vom Soforttyp war neben der Vorgeschichte einer Rhinitis ein positiver Prick-Test bzw. der Nachweis von allergenspezifischem IgE im Serum (RAST-Test) auf Gräserpollen. Für den Prick-Test wurde ein Tropfen einer allergenhaltigen Lösung auf die Haut gebracht und mit einer Nadel vorsichtig in die Haut gestochen. Dadurch kann die Allergenlösung durch die Epidermis gelangen und in der Dermis mit Mastzellen reagieren. Bei positiver Reaktion entstand nach ca. 15 min. eine Quaddel. Zur Positivkontrolle diente eine Histaminlösung, als Negativkontrolle eine Kochsalzlösung

## **2. Methoden**

### **2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **2.1.1 Allgemein**

Alle Arbeitsschritte zur Isolation und Kultivierung von Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. In der Zellkultur eingesetzte Plastikartikel wurden steril und endotoxinfrei bezogen. Glasinstrumente wurden vor ihrem Einsatz für 4 h bei 180°C sterilisiert und Lösungen 20 min bei 1.2 bar und 120°C autoklaviert bzw. durch einen 0.2 µm Sterilfilter filtriert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

#### **2.1.2 Bestimmung der Lebendzahl durch Trypanblaufärbung**

Die Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau vermischt. Die intakte Zellmembran ist ca. 5 min für Trypanblau undurchlässig, dagegen ist bei toten Zellen die Membran permeabel, so dass sie nach wenigen Sekunden blau angefärbt sind. 10 µl der mit Trypanblau vermischten Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe: 0.1 mm, Fläche von einem Großquadrat: 1mm<sup>2</sup>) gegeben. Bei einer 200 x Vergrößerung wurde ein Großquadrat ausgezählt, wobei nur die lebenden Zellen gezählt wurden.

Die Anzahl der Zellen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$[\text{Anzahl der Zellen in einem Großquadrat}] \times [\text{Verdünnungsfaktor}] \times [\text{Kammerfaktor}] = [\text{Zellen / ml}]$$

Kammerfaktor = 10<sup>4</sup>

#### **2.1.3 Kryokonservierung**

Die Kryokonservierung der Zelllinie COS-7 erfolgte bei -178°C in flüssigem Stickstoff. Dazu wurden 1 x 10<sup>7</sup> Zellen pelletiert (400 x g; 5 min; 4°C) und in 1 ml Einfriermedium (90% FCS und 10% DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension mit dem



Einfriermedium wurde dann in einem Kryoröhrchen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach 24 h erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff.

Die Kryokonservierung von PBMC erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Hierbei wurden  $7 \times 10^7$  PBMC pelletiert und in 810  $\mu\text{l}$  IMDM mit 10% autologem Plasma resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 180  $\mu\text{l}$  DMSO und 810  $\mu\text{l}$  autologem Plasma in ein Kryoröhrchen gegeben und maximal einen Monat eingefroren.

Zur Reaktivierung wurden die Zellen aufgetaut, in 15 ml IMDM aufgenommen und zentrifugiert (400 x g; 5 min;  $4^{\circ}\text{C}$ ). Danach wurden sie zur weiteren Kultur in Medium aufgenommen.

### **2.1.4 Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)**

Die Gewinnung von PBMC aus „Buffy-Coats“ erfolgte mittels Dichtezentrifugation. Hierzu wurde das Blut in einem Verhältnis von 1:3 mit warmem PBS in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben auf ein Endvolumen von 35 ml. Das verdünnte Blut wurde anschließend mit 10 ml Ficoll 1.077 unterschichtet und zentrifugiert (700 x g; 20 min;  $20^{\circ}\text{C}$ ; ohne Bremse). Durch die Dichte des Ficolls kommt es bei dieser Zentrifugation zur Trennung der einzelnen Zellfraktionen

Granulozyten und Erythrozyten, die eine höhere Dichte besitzen, befinden sich unterhalb der Ficoll-Lösung, die übrigen Zellen (Lymphozyten, Monozyten, Thrombozyten) mit einer geringeren Dichte befinden sich als trübe Interphase oberhalb der Ficoll-Lösung. Oberhalb der Interphase ist das zellfreie Plasma, das für die Zellkultur abgenommen und inaktiviert wurde (30 min;  $56^{\circ}\text{C}$ ). Anschließend wurde das nun inaktive Plasma zentrifugiert (1500 x g; 5 min;  $4^{\circ}\text{C}$ ), um ausgefallene Proteine abzutrennen. Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen und jeweils 20 ml der Suspension mit 30 ml  $4^{\circ}\text{C}$  kaltem PBS verdünnt und dann zentrifugiert (600 x g; 5 min;  $4^{\circ}\text{C}$ ). Daraufhin wurden die Zellen zweimal gewaschen mit je 50 ml  $4^{\circ}\text{C}$  kaltem PBS (400 x g; 5 min;  $4^{\circ}\text{C}$ ), wobei die Thrombozyten weitgehend entfernt wurden.

### **2.1.5 Zellseparation und Kultivierung allergengepulster dendritischer Zellen**

#### **2.1.5. Isolation von Monozyten**

Da Monozyten sehr schnell an Plastik adhäreren, können sie von den Lymphozyten, die nur schwach adhäreren, abgetrennt werden. Zur Durchführung dieser sogenannten Kurzzeitadhärenz wurde in jede Vertiefung einer 6-Well-Platte 2 ml RPMI-1640 mit 3% autologem Plasma vorgelegt und für 5 min präinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von  $1 \times 10^7$  PBMC in jede Vertiefung. Anschließend erfolgte eine 45 minütige Inkubation im Brutschrank. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Vertiefung jeweils dreimal mit 37°C warmen PBS gespült. Dabei wurden Lymphozyten und Thrombozyten aus der Vertiefung entfernt, die stark adhärenen Monozyten verblieben auf der Platte und wurden weiter in Kultur genommen.

#### **2.1.5.2 Kultivierung allergengepulster dendritischer Zellen**

Dendritische Zellen wurden nach einem modifizierten Protokoll von *Romani et al.* aus Monozyten gezüchtet (39). Die durch Kurzzeitadhärenz gewonnenen Monozyten wurden in 3 ml IMDM 15 Medium pro Vertiefung einer 6-Well-Platte, unter Zugabe von 1% autologem Plasma und jeweils 1000 U/ml IL-4 und GM-CSF, kultiviert. An Tag 3 wurden aus jeder Vertiefung 850 µl Medium abgenommen und durch 1 ml frisches Medium mit 1% autologem Plasma, 1000 U/ml IL-4 und GM-CSF ersetzt. Nach sechs Tagen wurden die Zellen nach dem gleichem Schema behandelt. Zusätzlich erfolgte die Zugabe der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  (2000 U/ml), TNF- $\alpha$  (1000 U/ml) und PGE<sub>2</sub> (1 µg/ml). Dadurch wurde die vollständige Ausreifung der dendritischen Zellen induziert. Die Zellen wurden dann mit dem Adenovirus Ad-Phl p1 transfiziert. Der Allergenextrakt, der nur zu den nicht-transfizierten Zellen zugegeben wurde, wurde zum selben Zeitpunkt in einer Konzentration von 5 µg/ml in die Kultur gegeben. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen durch starkes Abspülen geerntet.

### **2.1.5.3 Isolation von T-Zellen**

Um T-Zellen zu isolieren, wurde eine Aufreinigung über Antikörper-gebundene paramagnetische Microbeads (MACS) durchgeführt. Dabei werden die Zellen nach der magnetischen Markierung durch eine Separationssäule gegeben, die an einem starken Magneten befestigt ist. Durch eine Matrix in der Säule entsteht ein Gradientenmagnetfeld. Die magnetisch markierten Zellen bleiben aufgrund dieses magnetischen Feldes in der Säule hängen, während die unmarkierten Zellen durchwandern und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen werden. Auf diese Weise werden die unmarkierten von den markierten Zellen getrennt.

Zur Vorbereitung der Separationssäule wurde diese mit 4 ml MACS-Puffer gespült. Währenddessen wurden PBMCs mit 50 µl CD4- bzw. CD8-Microbeads mit 1:5 MACS-Puffer verdünnt bei 4°C für 15 min. inkubiert, danach mit PBS gewaschen, bei 400 g für 5 min. zentrifugiert und dann in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit 3 x 3 ml MACS-Puffer gespült, der Durchlauf, in dem sich CD14<sup>+</sup> Zellen befinden, wurde in einem 15 ml Reaktionsgefäß aufgefangen und 5 min. zentrifugiert. Auf die Separationssäule wurden nun 6 ml MACS-Puffer gegeben und die Säule vom Magneten getrennt. Mit einem Stempel wurden jetzt die magnetisch markierten CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus der Säule gedrückt, in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und für 5 min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium aufgenommen, gezählt und für die Kokultur mit dendritischen Zellen eingesetzt.

### **2.2 Zellcharakterisierung**

Die Morphologie der Zellen wurde direkt im Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Die Reinheit und Zusammensetzung der Zellpopulation, sowie die Zellentwicklung in der Kultur wurde anhand der spezifischen Oberflächenmoleküle bestimmt. Dazu wurde die Durchflußzytometrie eingesetzt. Hierbei wurden die Oberflächenmoleküle durch spezifische Antikörper markiert. Diese sind entweder direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt oder werden durch einen weiteren farbstoffgekoppelten Antikörper sekundär markiert. Durch die Lichtemission der Fluoreszenzfarbstoffe, bei Anregung mit kurzwelligem Licht, konnten die Oberflächenmoleküle auf diese Weise sichtbar gemacht werden.

### **2.2.1 Durchflußzytometrie**

Bei der Durchflußzytometrie (FACS = „fluorescence activated cell sorter“) werden die Zellen in einer dünnen Glaskapillare einzeln an einem Argonlaserstrahl der Wellenlänge 488 nm vorbeigeleitet. Dabei emittieren die an den Zellen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe Licht, welches durch zwei Fotosensoren, mit Filtern für bestimmte Wellenlängen, gemessen wird. Der Sensor FL-1, mit einem Filter von 530nm, misst das emittierte Licht des Fluoresceinderivates Dichlortriazinylaminofluorescein (DTAF). Der Sensor FL-2 mit einem Filter von 585 nm misst das emittierte Licht von Phycoerythrin (PE). Dadurch ist es möglich, zwei Oberflächenmoleküle in einer Messung zu charakterisieren. Durch das Messen des Lasers in Strahlrichtung (Sensor FSC) wird zusätzlich die Größe der Zelle und durch die Bestimmung der gestreuten Strahlung (Sensor SSC) wird die Granularität der Zelle erfasst.

Für die Durchführung der Immunfluoreszenz-Markierung wurden pro Ansatz bis zu  $1 \times 10^6$  Zellen in einem Rundbodenröhrchen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und pelletiert (400 x g; 5 min; 4°C). Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 µl des Primärantikörpers (5 µg/ml) und eine 20 minütige Inkubation bei 4°C. Daraufhin wurden die Zellen mit 750 µl FACS-Puffer gewaschen und im Fall der indirekten Färbung mit 30 µl des sekundären Antikörpers (5 µg/ml) für weitere 20 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 250 µl FACS-Puffer aufgenommen und gemessen.

### **2.4 Proliferationstests**

Um die Fähigkeit der dendritischen Zellen Antigene zu präsentieren und somit T-Zellen zu aktivieren zu bestimmen, wurden Proliferationstests durchgeführt. Hierbei wird radioaktiv markiertes [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut, durch das Messen der Radioaktivität kann auf die Gesamtproliferation geschlossen werden.

Bis zur Auswertung wurde die Platte bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen der Platte wurde der Inhalt der Vertiefungen durch einen Fiberglasfilter abgesaugt, an dem die nun radioaktiv markierte DNA bindet. Der Filter wurde 20 min bei 100°C

getrocknet und danach in eine Kunststoffolie eingeschweißt und 10 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben. Durch die radioaktive Strahlung wurde diese zur Lichtemission angeregt, die im  $\beta$ -Counter in Form von Impulsen (cpm = „counts per minute“) gemessen werden konnte.

### **2.4.1 Allergenpräsentation transfizierter dendritischer Zellen**

Um die Proteinpräsentation der transfizierten dendritischen Zellen zu überprüfen, wurde die Proliferation und die Zytokinproduktion von T-Zellen oder aufgereinigten CD4<sup>+</sup>-Zellen gemessen. Alle Versuche erfolgten im autologen System, d.h. dass sowohl die dendritischen Zellen als auch die T-Zellen vom selben Spender stammten.

An Tag 6 der Kultur wurden jeweils eine Vertiefung nicht-transfizierter dendritischer Zellen mit den Allergenen Gräserpollenextrakt in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml gepulst oder mit Ad-Phl p1 (MOI 3, 30, 300) transfiziert. Alle Ansätze wurden an Tag 6 der Kultur mit den proinflammatorischen Zytokinen stimuliert und nach weiteren 48 h geerntet.

Zur Messung der Proliferation wurden jeweils  $1 \times 10^5$  in 100  $\mu$ l IMDM der frisch isolierten T-Zellen in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte gegeben und mit den allergengepulsten oder transfizierten dendritischen Zellen primärstimuliert. Dabei wurde eine 1:4 Titration der  $1 \times 10^4$  dendritischen Zellen in 200  $\mu$ l Gesamtvolumen IMDM vorgenommen. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Fünf Tage nach der Primärstimulation wurde die Platte zur Bestimmung der Proliferationsdaten mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin gepulst und nach sechs Stunden eingefroren.

Für die Zytokinbestimmung wurden jeweils  $5 \times 10^5$  in 1000  $\mu$ l IMDM der T-Zellen in eine Vertiefung einer 48-Well-Platte gegeben, mit  $5 \times 10^4$  allergengepulsten oder transfizierten dendritischen Zellen primärstimuliert und nach sieben Tagen sekundär mit dendritischen Zellen stimuliert. Die Überstände wurden dann nach 24 h abgenommen und die Zytokine mittels ELISA gemessen.

### **2.5 Bestimmung der Zytokinproduktion mittels ELISA**

Die Bestimmung der Zytokine in den Überständen erfolgte mittels ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“). Bei dieser Methode wird ein monoklonaler Antikörper,

der spezifisch für das nachzuweisende Protein ist, am Boden der Vertiefung einer 96-Well-Platte immobilisiert. Die restliche Oberfläche wird mit Protein (bovines Serumalbumin) abgedeckt. Nun wird der Überstand, der untersucht werden soll, in die Vertiefung gegeben. Der, am Boden der Vertiefung festgesetzte Antikörper bindet das Protein, so dass es bei den folgenden Waschschrritten nicht ausgewaschen werden kann. Anschließend wird ein biotinylierter Sekundärantikörper zugegeben, der an ein anderes Epitop des Proteins bindet. Durch Waschen werden nicht gebundene, überflüssige Antikörper entfernt. Daraufhin wird Streptavidin, welches an Peroxidase gekoppelt ist und das an Biotin bindet, zugegeben. Nach erneutem Waschen der Platte wird eine Substratlösung (ABTS) mit  $H_2O_2$  zugegeben. Das  $H_2O_2$  wird durch die Peroxidase gespalten und bewirkt dadurch eine Oxidation des ABTS. Dadurch entsteht ein Farbumschlag nach grün, welcher photometrisch, bei einer Wellenlänge von 415 nm, gemessen werden kann. Der Farbumschlag ist proportional zur Menge des gebundenen Sekundärantikörpers.

Für die Bestimmung der Zytokine wurde eine 96-Well-Maxisorpplatte mit 50  $\mu$ l Primärantikörper pro Vertiefung (2  $\mu$ g/ml in Natriumphosphatpuffer, pH 9, Ausnahme: IL-12 mit 8  $\mu$ g/ml in Natriumphosphatpuffer, pH 6) gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 200  $\mu$ l PBS 1% BSA in jede Vertiefung für zwei Stunden bei 37°C zugegeben. Daraufhin wurde zweimal mit PBS gewaschen, und dann die Kulturüberstände und die, in einer 1:2 Verdünnung titrierten Standards und reines Medium als Leerwert auf die Platte gegeben (100  $\mu$ l / Vertiefung). Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C und danach vier Waschschrritte. Daraufhin wurden 100  $\mu$ l des biotinylierten Sekundärantikörpers (1  $\mu$ g/ml in PBS 0.1% BSA) zugegeben und die Platte für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach sechs Waschschrritten und der Zugabe von 100  $\mu$ l Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin (0.5  $\mu$ g/ml) folgte eine 30 minütige Inkubation und acht Waschschrritte. Anschließend wurden 100  $\mu$ l der Substratlösung pro Vertiefung zugegeben. Nach 30 bis 60 Minuten wurde die Extinktion bei 405 nm gemessen, wobei die maximale Extinktion den Wert von 2.6 nicht überschreiten durfte. Von den gemessenen Werten wurde die Extinktion des Leerwertes abgezogen. Mit Hilfe der „Microplate Manager“ Software wurde eine Eichgerade erstellt und die Konzentration der Kulturüberstände bestimmt. Das

Detektionslimit lag bei allen Zytokinen bei 32 pg/ml, mit Ausnahme von IL-4 mit 8 pg/ml.

## **2.7 Molekularbiologische Experimente**

### **2.7.1 Plasmidexpansion und Aufreinigung**

Für die Expansion der Expressionsvektoren pcDNA 1.1/Amp-Phl p1 und pEGFP-C wurden *Escherichia coli* Bakterien des Stammes XL 1-Blue mittels Elektroporation mit diesen Vektoren transfiziert und expandiert. Anschließend wurden die Vektoren durch alkalische Lyse aufgereinigt.

#### **2.7.1.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien**

Bei der Elektroporation wird eine Spannung von 2 kV an die Bakteriensuspension angelegt. Dadurch wird die Zellmembran der Bakterien durchlöchert und die Plasmide können in die Bakterien eindringen. Es müssen vorher alle Salze entfernt worden sein, damit es nicht zu einem starken Stromfluß kommt und das Medium erhitzt wird.

Hierzu wurden die Bakterien XL1-Blue MRF<sup>+</sup> in 250ml LB-Medium bei 37°C auf dem Bakterienrührer bei 180 upm bis zu einer optischen Dichte (564 nm) von 0.5 bis 0.7 expandiert. Die Bakterien, die sich dann in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden für 30 min auf Eis gestellt und danach zentrifugiert (4000 x g; 15 min; 4°C). Das Bakterienpellet wurde anschließend in 500 ml Aqua dest. mit 10% Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, wobei die Bakterien erst in 20 ml und dann in 2 ml kaltem 10%igen Glycerin aufgenommen wurden. Zur Lagerung wurden 60 µl Aliquots der Bakterien bei -80°C eingefroren.

#### **2.7.1.2 Bakterientransformation**

Die Elektroporationsküvetten mit einer Spaltbreite von 0.2 cm wurden auf Eis vorgekühlt und danach wurden 50 µl der elektrokompetenten Bakterien zusammen mit 10 ng DNA, gelöst in Aqua dest., in die Küvette gegeben und durch Vortexen gemischt. Die Elektroporation erfolgte bei 2 kV für 10 msec und 100 µF. Die Bakterien wurden

sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und bei 37°C für eine Stunde auf dem Bakterienschüttler bei 180 upm inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit einer ausgeglühten Impföse auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (pcDNA1.1/Amp: Ampicillin; pCEP-4/Amp: Ampicillin; pEGFP-C: Kanamycin) ausgestrichen.

### **2.7.1.3 Übernachtkultur und Kryokonservierung positiver Klone**

Nach 18 h wurden positive Klone auf der Agarplatte sichtbar. Jeweils eine deutliche Einzelkolonie wurde mittels einer Pipettenspitze in 15 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und für weitere 18 h auf dem Bakterienschüttler bei 37°C und 180 upm expandiert. Die Bakteriensuspension konnte dann entweder sofort weiterverwendet oder zur späteren Verwendung eingefroren werden. Dazu wurde 850 µl der Bakterien mit 150 µl sterilem Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren.

### **2.7.1.4 Plasmid-Minipräparation**

Um das Plasmid nachzuweisen, wurde eine DNA-Minipräparation (alkalische Lyse) und anschließend eine Auftrennung in einem DNA-Probegel durchgeführt. Hierzu wurden 2 ml der Übernachtkultur in einem 2 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert (5000 x g; 1 min; 20°C) und das Pellet in 150 µl SET-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 350 µl Lysepuffer wurde die Lösung durch vorsichtiges Invertieren gemischt und für fünf Minuten inkubiert. Durch das Detergens wurden die Bakterien aufgebrochen, wobei die DNA an der Zellwand haften blieb. Die DNA der Plasmide dagegen geht in Lösung. Es folgte die Zugabe von 250 µl Neutralisierungspuffer, erneutes vorsichtiges Invertieren und eine Inkubation für 10 min auf Eis. Bei der anschließenden Zentrifugation (15000 x g; 15 min; 20°C) wurde das denaturierte Protein mit der DNA pelletiert. 700 µl des Überstandes, der die Plasmid-DNA enthält, wurde abgenommen und die DNA durch Zugabe von 700 µl Isopropanol gefällt (15000 x g; 15 min; 20°C). Das Pellet wurde zur Entfernung des Isopropanols in 400 µl 70% Ethanol gewaschen (15000 x g; 10 min; 20°C). Das Pellet, in dem sich die Plasmid-DNA befindet, wurde in 50 µl Aqua dest. gelöst.



#### **2.7.1.5 DNA-Probegel**

Um die Plasmide zu identifizieren, wurden sie zunächst durch ein Restriktionsenzym linearisiert und in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Restriktion erfolgte durch das Restriktionsenzym Eco RI und dem hierzu gelieferten Puffer H (10 x). 1 µg des Plasmids wurden mit 2 µl Puffer H und 1 µl Eco RI (10 U) auf 20 µl Aqua dest. aufgefüllt. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37 °C wurde der Ansatz mit 2 µl Ladepuffer gemischt und auf ein 1% Agarosegel mit 0.02 µl/ml Ethidiumbromid gegeben. Die Auftrennung erfolgte bei 50 V für 2 h. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, dadurch können die DNA-Banden unter dem UV-Licht sichtbar gemacht werden.

#### **2.7.1.6 Plasmid-Maxipräparation**

Die Plasmid-Maxipräparation wurde mit dem „Quiagen Endofree Plasmid Kit“ durchgeführt. Hierzu wurden 150 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versehen und mit 300 µl der Übernacht-Bakterienkultur angeimpft. Die Plasmidaufreinigung erfolgte dann gemäß den Anleitungen des Herstellers. Die DNA wurde, abweichend vom Versuchsprotokoll, in 300 µl sterilem Aqua dest. aufgenommen und die DNA-Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Konzentration der DNA ergab sich aus folgender Formel:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 = [\mu\text{g/ml}]$$

Die Lösung wurde anschließend auf 1 µg/µl DNA eingestellt.

### **2.7.2 Vermehrung und Aufreinigung rekombinanter Adenoviren**

#### **2.7.2.1 Zellkultur von 293- und Cre8-Zellen**

Als Kulturmedium wurde DMEM mit 10% FCS, 1% Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin verwendet. Die Zellen wachsen als Monolayer und wurden alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:3 geteilt. Dazu wurden nicht adhärenente Zellen mit 5 ml PBS von der Kulturplatte abgespült, die Waschflüssigkeit abgesaugt und mit 2 ml EDTA-Trypsin für

5 min. bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 7 ml Medium, das auf 37°C erwärmt war von der Oberfläche ab gespült, in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min. zentrifugiert. Das Pellet wurde mit frischem Medium resuspendiert und die Zellen in neue Platten ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.7.2.2 Vermehrung rekombinanter Adenoviren**

3 x 10<sup>4</sup> 293-Zellen wurden in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte ausgesät und solange im Brutschrank bei 37°C inkubiert bis die Zellen konfluent gewachsen waren. Dann wurde das Medium abgesaugt, 500 µl frisches 37°C warmes Medium zugegeben und die Zellen mit 100 µl der Virusvorkultur (der Firma QBiogene), die das Gen für Phl p1 enthält, infiziert. Nach 45 min. wurden weitere 500 µl Medium zu der Kultur zugegeben. Nach Eintreten des zytopathischen Effektes (36-48 h) runden und lösen sich die Zellen ab. Die abgelösten Zellen und der Überstand wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C eingefroren. Der Überstand wurde insgesamt 3 x eingefroren und aufgetaut, um die Zellen zu zerstören, damit die Viruspartikel freigesetzt werden.

Nun wurden in zehn 15 cm Kulturschalen 293-Zellen ausgesät und bis zur Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und frisches dazugegeben. Dann wurden diese mit 1 ml des vorher gewonnenen Überstandes, der Viruspartikel enthält, infiziert. Nach Eintreten des zytopathischen Effektes wurde das Medium und die Zellen in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min. bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml Adeno-Resuspensions-Puffer aufgenommen und zusammengeführt und 3 x in einem Trockeneis-Alkohol-Gemisch eingefroren und aufgetaut. Danach wurde für 5 min. und 2300 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthält nun freigesetzte Viruspartikel.

### **2.7.2.3 Aufreinigung von Adenoviren**

Ein Ultraschallzentrifugenröhrchen wurde mit 3 ml schwerer CsCl-Lösung ( $\delta = 1,4$  g/ml) befüllt und mit 3 ml leichter CsCl-Lösung ( $\delta = 1,2$  g/ml) überschichtet. Der CsCl

Gradient wurde mit 5 ml Virus-Zell-Lysat überschichtet und 1 h bei 4°C und 30000 rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das aufgereinigte Virus erscheint als hellgrau-blaue Bande im CsCl-Gradienten. Das Zentrifugenröhrchen wurde in ein Laborstativ gespannt, mit einer 2 ml Spritze mit Kanüle unterhalb der Virusbande angestochen und die Virusbande in die Spritze gesaugt. Das Virus wurde nun in einen Dialyseschlauch, der vorher für 15 min. in 1mM EDTA ,2% Natriumcarbonat gekocht wurde und daraufhin in Wasser und 5 mM EDTA gewaschen wurde, überführt. Der Dialyseschlauch wurde nun mit Klammern verschlossen und zweimal in 500 ml Saccharoselösung bei 4°C dialysiert (1. Dialyseschritt 5 h, 2. Dialyseschritt 12 h).

### **2.7.2.4 Photometrische Quantifizierung einer Adenoviruspräparation**

2 µl der Viruspräparation wurden mit Aqua dest. zu einem Volumen von 100 µl (1:50) in einer Küvette verdünnt. Am Photometer wurde nun der Nullwert mit Aqua dest. bei 260 nm eingestellt, daraufhin die Probe gemessen und nach folgender Formel die MOI berechnet:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1.1 \times 10^{12} = \text{Partikel/ml}$$

$$100 \text{ Partikel} = 1 \text{ pfu (plaque forming unit)}$$

$$3 \times 10^8 \text{ pfu} = \text{MOI 300 (für } 1 \times 10^6 \text{ zu infizierende Zellen)}$$

### **2.7.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz**

#### **2.7.3.1 Messung der EGFP-Expression**

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurde die Effizienz der Transfektion mit EGFP-C bestimmt. Hierzu wurden die Zellen geerntet und 250 µl der Zellsuspension im Durchflußzytometer gemessen.

#### **2.7.3.2 Bestimmung der Proteinexpression mittels Western-Blot**

Die Bestimmung der Expression des Allergens Phl p 1 erfolgte mittels Western-Blot. Dabei werden die Proteine nach ihrer Größe im Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine auf einer Polyvinylidenfluorid-

Membran immobilisiert und durch einen spezifischen Antikörper und eine Lumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Hierfür wurden  $2 \times 10^6$  Zellen pelletiert (400 x g; 5 min; 4°C) und das Pellet in 50 µl Lysepuffer (bei dendritischen Zellen) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die im Lysepuffer enthaltenen Proteaseinhibitoren verhindern eine Degradierung der Zellen durch eigene Proteasen. Durch Zentrifugation (15000 x g; 10 min; 4°C) wurden die Zellfragmente abgetrennt und der Überstand abgenommen. Um die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufzubrechen, wurden maximal 50 µl des Lysates mit 1/3 Volumen SDS- und mercaptoethanolhaltigem Puffer, 4-fach konzentriert, gemischt und für 5 min gekocht. Dabei lagert sich das SDS an das Protein und überdeckt die elektrische Ladung des Proteins mit einer stark negativen Ladung. Das Lysat wurde nun auf ein 15% Polyacrylamidgel aufgetragen. Zusätzlich wurde noch 10 µl eines Molekulargewichtsmarker (Bluestain) mitaufgetragen, um das Molekulargewicht der Proteine bestimmen zu können. Die Elektrophorese wurde für 3 h bei 45 mA durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine auf die Polyvinylidenfluorid-Membran durch einen Elektrotransfer überführt. Dazu wurde die Membran 30 sec mit Methanol gespült, dann mit Aqua dest. gewaschen und daraufhin im Anodenpuffer mit 10% Methanol für 5 min äquilibriert. Nachdem die Elektrophorese beendet war, wurde das Sammelgel abgetrennt und der Blot nach folgendem Schema aufgebaut:

- Anode mit Anodenpuffer benetzt
- 4 Stücke Whatmanpapier mit Anodenpuffer benetzt
- Polyvinylidenfluorid-Membran
- Trenngel
- 4 Stücke Whatmanpapier mit Kathodenpuffer benetzt
- Kathode mit Kathodenpuffer benetzt
- Bleigewichte

Es wurde eine Spannung von 250 mA für 45 min angelegt, dabei wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode und binden an die Polyvinylidenfluorid-Membran.

Die Detektion von Phl p 1 erfolgte mit dem Antikörperüberstand des Hybridoms IG12. Um freie Stellen auf der Membran abzudecken, wurde sie mit Rotiblock für 30 min. bei RT unter leichtem Schütteln (60 upm) geblockt. Anschließend wurde die Membran in TPBS gewaschen und anschließend mit 4 ml des Primärantikörpers, 1:20 in TPBS 5%

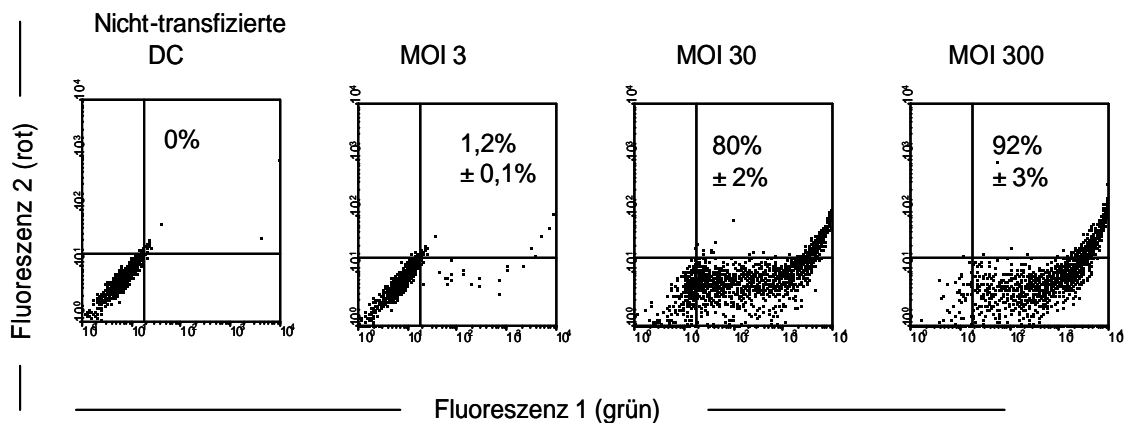
BSA verdünnt, in eine Plastikfolie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler mit 60 upm inkubiert. Danach wurde die Membran fünfmal in TPBS gewaschen (2 x 15 sec, 3 x 10 min) und dann mit 5 ml Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (verdünnt 1:5000 in TPBS 5% BSA) für 60 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut fünfmal gewaschen.

Die Detektion erfolgte durch die Zugabe der ECL+Detektionslösung, die von der Peroxidase umgesetzt wurde und hierbei Licht emittierte. Hierfür wurden die beiden Komponenten des ECL+Detektions-Kits zu einem Gesamtvolumen von 2 ml 40:1 gemischt. Die abgetropfte Membran wurde für 1 min mit der Lösung benetzt, das überschüssige Substrat durch Abtropfen entfernt und in einer Plastikfolie eingeschweißt. Die fluoreszierenden Banden wurden auf dem aufgelegten Röntgenfilm als schwarze Banden nach dem Entwickeln sichtbar.

### III. Ergebnisse

#### 1. Bestimmung der Transfektionseffizienz nach Transfektion der dendritischen Zellen mit Ad-EGFP

Reife dendritische Zellen wurden mit unterschiedlichen MOI (multiplicity of infection, gibt die Anzahl der Viruspartikel an) mit einem adenoviralen Vektor, der für das „enhanced green fluorescent protein“ (Ad-EGFP) kodiert, transfiziert und nach 48 h die Transfektionseffizienz mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt. Das EGFP ist im FL-1-Kanal durch seine grüne Fluoreszenz zu sehen. Bei einer Viruskonzentration von MOI 3 sind im FL-1-Kanal 1,2% der dendritischen Zellen mit EGFP transfiziert, bei MOI 30 sind es 80% und bei einer Konzentration von MOI 300 sind 92% der dendritischen Zellen mit EGFP transfiziert. Als Negativkontrolle wurden nicht-transfizierte dendritische Zellen eingesetzt (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1** Transfektionseffizienz bei dendritischen Zellen nach Transfektion mit Ad-EGFP

Die dendritischen Zellen wurden an Tag 6 der Kultur mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen (Ad-EGFP) transfiziert, zur vollständigen Ausreifung gebracht und 48 h später die Transfektionsrate im Durchflußzytometer untersucht. Transfizierte Zellen sind auf der x-Achse (Fluoreszenz 1) zu sehen.

## **2. Bestimmung der Viabilität transfizierter dendritischer Zellen**

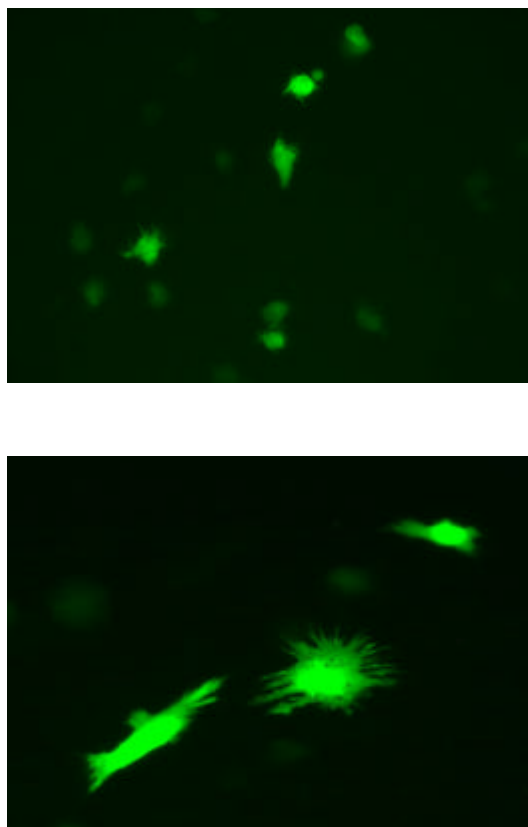
Die Viabilität von reifen, adenoviral transfizierten dendritischen Zellen wurde 48 h nach der Transfektion und der Ausfreifung mit Hilfe einer Trypanblaulösung mikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die adenovirale Transfektion keinen Einfluss auf die Viabilität hat. Die transfizierten dendritischen Zellen sind ebenso wie die nicht-transfizierten Zellen zu  $95\% \pm 1\%$  viabel (Abbildung nicht dargestellt).

## **3. Charakterisierung der für die Allergenpräsentation eingesetzten Zellen**

### **3.1 Vergleich transfizierter und nicht-transfizierter dendritischer Zellen**

Die adhärenenten Monozyten zeigten am Anfang der Kultur eine längliche ausgebreitete Form. Unter dem Einfluss der zugegebenen Wachstumsfaktoren IL-4 und GM-CSF veränderte sich die Morphologie, den nun unreifen dendritischen Zellen ging die Adhärenz verloren und die Zellen nahmen eine rundere Form an. Durch die Zugabe des Ausreifungscocktails, der aus PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  besteht, reiften die Zellen aus, bildeten Dendriten aus und lösten sich vollständig von dem beschichteten Boden der Zellkulturplatte.

Die adenoviral transfizierten Zellen zeigten dieselbe Morphologie wie die nicht-transfizierten reifen dendritischen Zellen. In Abbildung 3.2 sind mit Ad-EGFP transfizierte reife dendritische Zellen zu sehen. Man sieht, dass nahezu alle dendritischen Zellen, die sich in der Zellkulturschale befanden das Protein GFP exprimieren und dass die Zellen die typische Morphologie von reifen dendritischen Zellen aufweisen. Im unteren Bild ist eine stärkere Vergrößerung gezeigt. Links im Bild ist eine unreife dendritische Zelle mit ihrer typischen Morphologie zu sehen. Rechts ist eine reife dendritische Zelle dargestellt mit ihrer abgekugelten, runden Form und den ausgebildeten Dendriten.

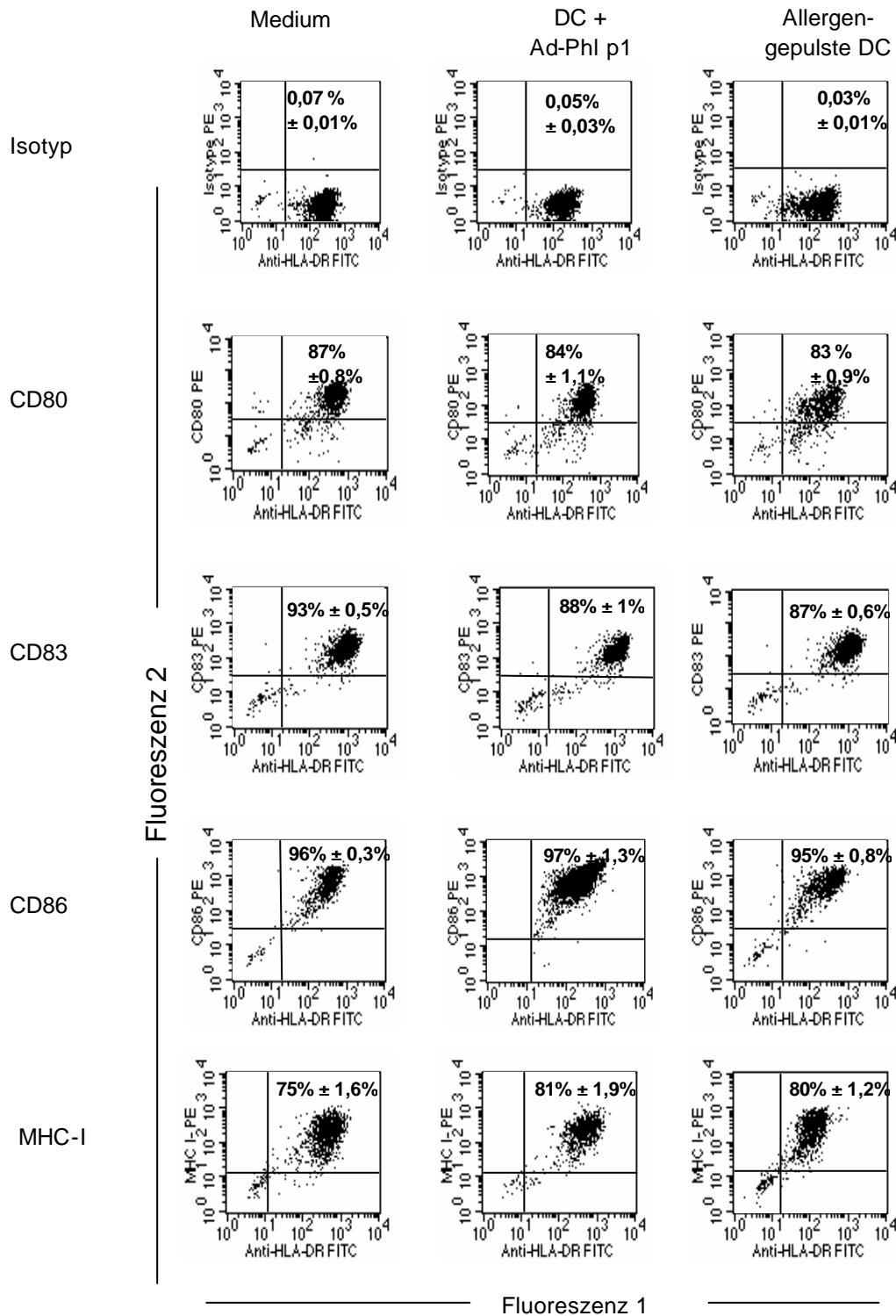


**Abb. 3.2** Reife dendritische Zellen wurden an Tag 6 der Kultur mit Ad-EGFP (MOI 300) transfiziert und 48 h später im Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Die transfizierten Zellen leuchten grün.

### ***3.2 Phänotyp der dendritischen Zellen während der Kultur***

An Tag 8 der Kultur wurde der Einfluss der adenoviralen Transfektion auf den Phänotyp der reifen mit Ad-Phl p1 transfizierten dendritischen Zellen im Durchflußzytometer untersucht. Als Kontrolle wurden reife nicht-transfizierte dendritische Zellen, die mit Gräserallergenprotein gepulst wurden und reife dendritische Zellen, die nicht mit Allergen gepulst waren (Medium), eingesetzt. Es wurde eine Doppelfärbung mit den entsprechenden Antikörpern gegen die verschiedenen Oberflächenmoleküle und gegen HLA-DR durchgeführt. Im FL-1-Kanal ist die Expression der HLA-DR-Moleküle zu sehen. Der FL-2-Kanal zeigt die Expression der Oberflächenmarker.



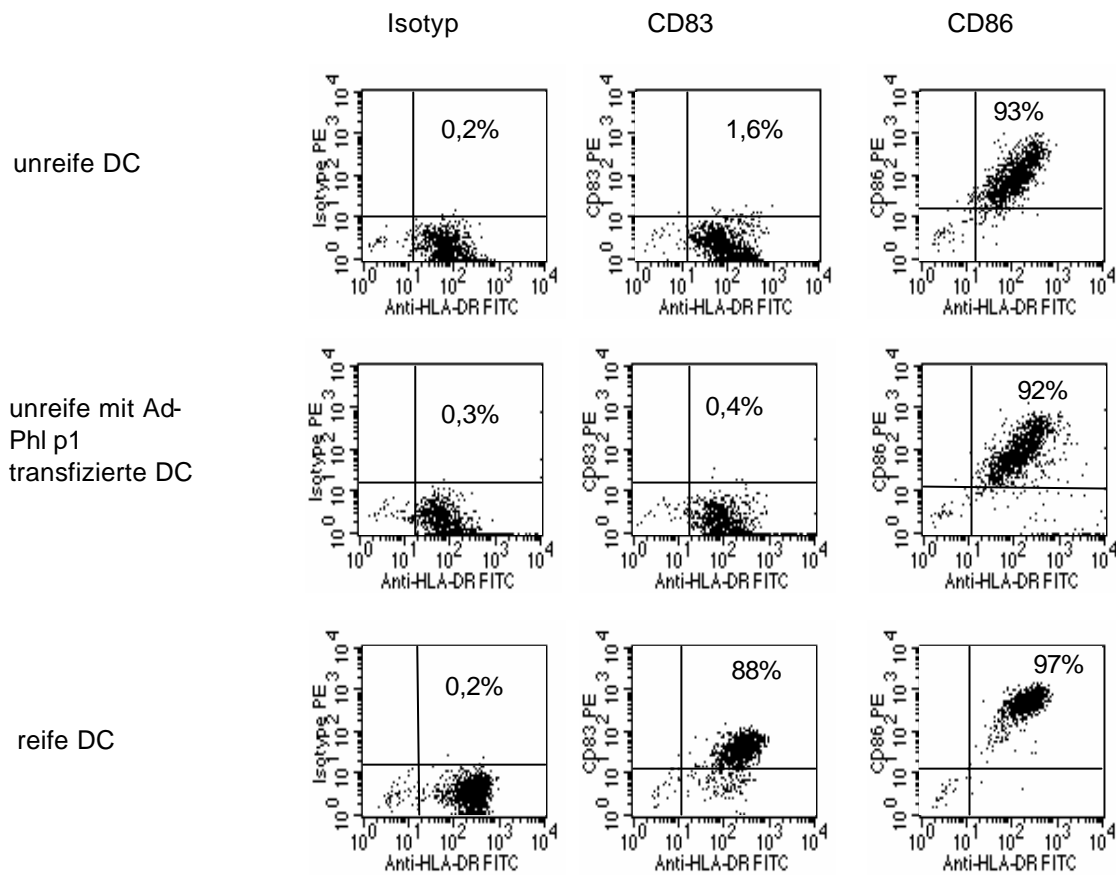


**Abb. 3.3** Phänotyp der reifen dendritischen Zellen nach Transfektion mit Ad-EGFP  
 Dendritische Zellen wurden wie in 2.1.5.2 beschrieben kultiviert und an Tag 6 vollständig ausgereift, mit 5 µg Gräserallergen gepulst oder mit Ad-Phi p1 (MOI 300) transfiziert. „Medium“ zeigt reife dendritische Zellen, die weder transfiziert noch mit Allergen gepulst waren. Nach 2 Tagen wurde der Phänotyp der Zellen mit Hilfe einer Doppelfärbung im Durchflußzytometer untersucht. Es sind keine Unterschiede in der Expression der Oberflächenmarker zu sehen.

Doppelt positive Zellen befinden sich im oberen rechten Quadranten. Es konnte bei den drei verschiedenen Zellpopulationen eine hohe Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und MHC-Klasse I, sowie eine starke Expression des Markers für reife dendritische Zellen CD83 gemessen werden (Abb. 3.3). Die adenovirale Transfektion hatte keinen Einfluss auf die Expression der Oberflächenmarker.

### ***3.3 Durch adenovirale Transfektion wird in unreifen dendritischen Zellen keine Ausreifung induziert***

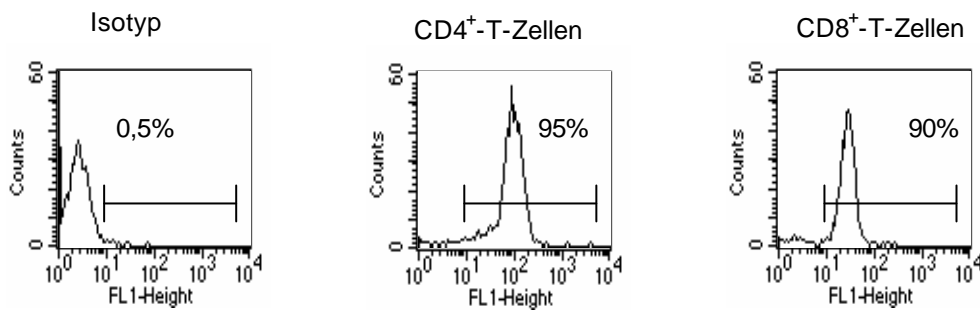
Zur Kontrolle, ob durch die Transfektion mit Adenoviren in unreifen dendritischen Zellen eine Ausreifung induziert wird, wurden an Tag 6 der Kultur unreife dendritische Zellen mit Ad-Ph1 p1 (MOI 300) transfiziert und nach 48 h die Expression bestimmter Oberflächenmarker mit Hilfe der Durchflußzytometrie untersucht. Hierfür wurden als Marker CD83, der charakteristisch für reife dendritische Zellen ist, überprüft. Außerdem wurde die Expression der Marker CD86 und HLA-DR, die schon von unreifen antigenpräsentierenden Zellen auf der Oberfläche getragen werden, untersucht. Dazu wurde eine Doppelfärbung vorgenommen. CD83 und CD86 sind in Abb. 3.4 auf der y-Achse zu sehen, während HLA-DR auf der x-Achse abgebildet ist. Doppelt positiv gefärbte Zellen sind im oberen rechten Quadranten zu sehen. Als Positivkontrolle wurden dendritische Zellen nach der Ausreifung, induziert durch proinflammatorische Zytokine, mit Ad-Ph1 p1 transfiziert und ebenfalls nach 48 h die Expression der Oberflächenmarker kontrolliert. Als Negativkontrolle dienten unreife, nicht-transfizierten dendritische Zellen. Es zeigte sich, dass sowohl die unreifen transfizierten als auch die untransfizierten dendritischen Zellen den Marker CD83 nicht auf ihrer Oberfläche tragen. Das Molekül CD86 wird von beiden Zelltypen exprimiert. Die ausgereiften dendritischen Zellen dagegen haben CD83 zu 88% auf ihrer Oberfläche, ebenso wie den Marker CD86 (97%). Alle untersuchten Gruppen exprimierten HLA-DR in vergleichbaren Mengen. Die Transfektion der unreifen dendritischen Zellen mit dem Adenovirus Ad-Ph1 p1 induziert keine Ausreifung der Zellen.



**Abb. 3.4** Expression der Oberflächenmarker auf unreifen dendritischen Zellen  
Unreife dendritische Zellen wurden wie in 2.1.5.2 beschrieben kultiviert und im unreifen Zustand mit Ad-Phl p1 (MOI 300) transfiziert. Danach wurde eine Doppelfärbung durchgeführt und die Expression der Oberflächenmoleküle im Durchflußzytometer untersucht.

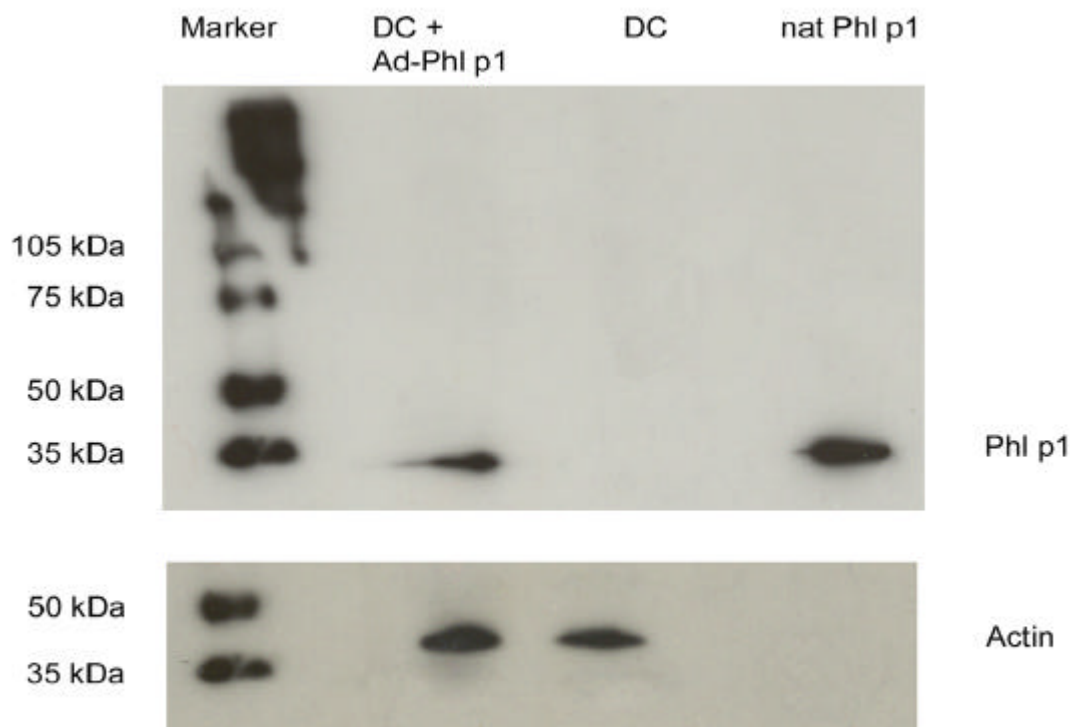
### 3.4 Phänotyp und Morphologie der verwendeten T-Zellen

Die in den Versuchen eingesetzten T-Zellen wurden nach Aufreinigung mittels MACS aus PBMC auf ihre Reinheit untersucht. Es zeigte sich, dass die aufgereinigten  $CD4^+$ -T-Zellen eine Reinheit von 95% und die  $CD8^+$ -T-Zellen eine Reinheit von 90% hatten (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5** Reinheit der aus PBMC aufgereinigten T-Zellen nach Depletion aus PBMC

#### 4. Expression der Allergenpeptide



**Abb.3. 6** Expression des Proteins Phl p1 von transfizierten dendritischen Zellen  
 Reife mit Ad-Phl p1 transfizierte dendritische Zellen exprimieren das korrespondierende Protein (linke Spur), die Negativkontrolle, nicht-transfizierte dendritische Zellen zeigen keine Expression des Proteins, während die bei der Positivkontrolle (nat Phl p1) eine deutliche Bande zu sehen ist. Als Proteinladekontrolle für dendritische Zellen wurde Actin verwendet.

Dendritische Zellen wurden mittels eines Adenovirus, der für das Allergen des Lieschgraspollens Phl p1 kodiert (Ad-Phl p1), transfiziert, nach 48 h lysiert und 5 µg des Lysates auf das Gel aufgetragen. Als Kontrolle wurden 0,5 ng des Proteins Phl p1 mit aufgetragen und 5 µg Lysat von dendritischen Zellen, die nicht transfiziert wurden. Die Expression des Allergens Phl p1 wurde im Western-Blot mit dem Antikörper BO12 nachgewiesen (Abb. 3.6). Bei den mit Allergen-DNA transfizierten dendritischen Zellen ist eine Bande in Höhe von 35 kDa zusehen, ebenso wie bei der Positivkontrolle, dem Protein Phl p1. Bei der Negativkontrolle, nicht-transfizierte dendritische Zellen ist keine Bande zu finden. Die mit Allergen-DNA transfizierten dendritischen Zellen exprimieren das korrespondierende Protein.

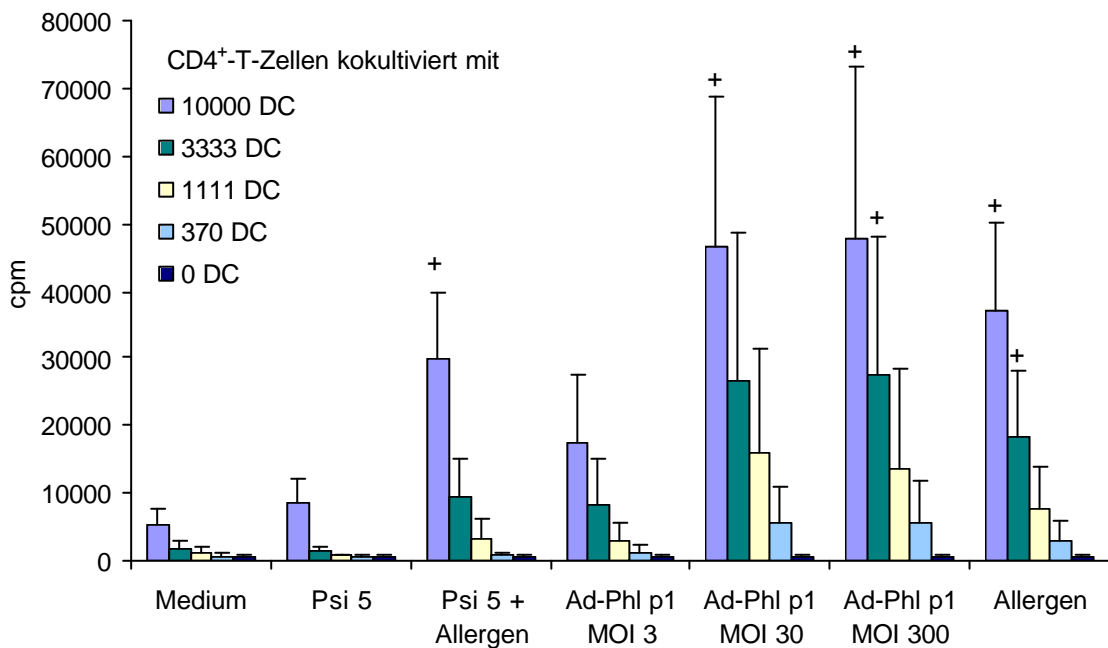
## **5. Induktion einer T-Zellproliferation durch transfizierte dendritische Zellen**

### **5.1 Induktion einer Proliferation von autologen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durch Allergen-DNA transfizierte dendritische Zellen**

Im Folgenden wurde analysiert, ob reife, mit Allergen-DNA transfizierte dendritische Zellen autologe CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu einer Proliferation anregen können. Als Negativkontrolle wurden nicht-transfizierte, reife dendritische Zellen eingesetzt (Medium) und als Kontrolle, welche Wirkung das Virus alleine hat, wurden dendritische Zellen mit dem Adenovirus Ψ5 transfiziert. Als Positivkontrolle dienten dendritische Zellen, die mit 5 µg Gräserallergengemisch gepulst waren (Gräser). Um zu überprüfen, ob das

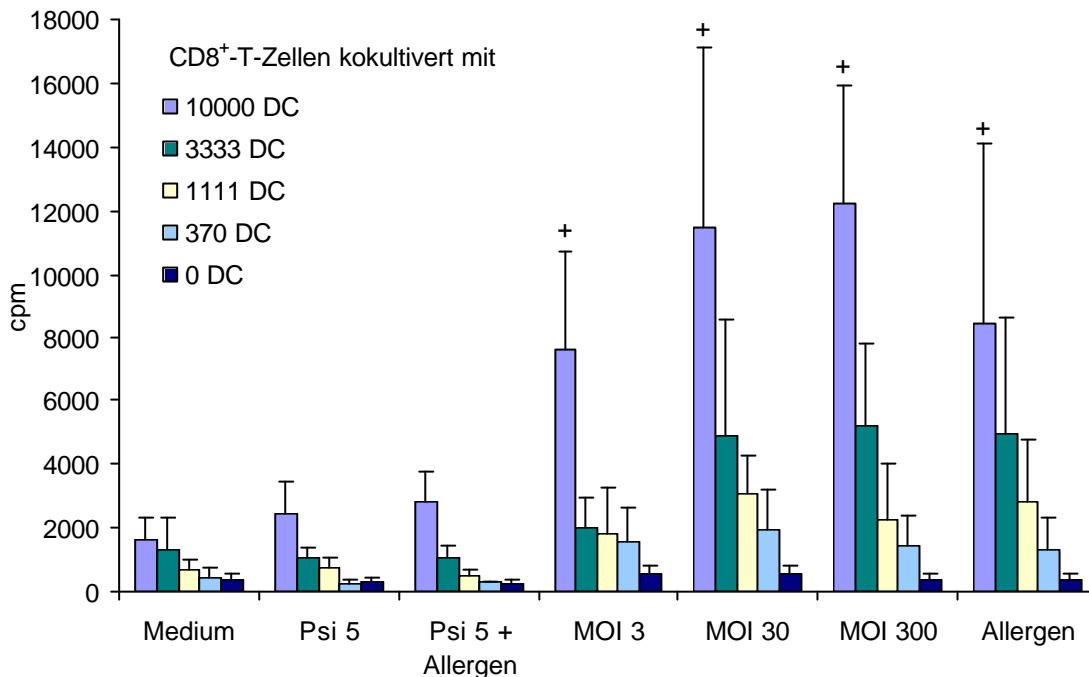
Virus einen verstärkenden Effekt auf die Proliferation der T-Zellen ausübt, wenn diese Gräserallergen von den dendritischen Zellen präsentiert bekommen, wurden dendritische Zellen mit Ψ5 transfiziert und mit 5 µg Allergen gepulst (Ψ5 + Gräser). Die untransfizierten dendritischen Zellen waren nicht in der Lage CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu einer Proliferation anzuregen. Auch die mit Ψ5 transfizierten dendritischen Zellen konnten die T-Zellen nur gering zu einer Proliferation anregen, während die mit Ad-Phl p1 transfizierten dendritischen Zellen eine sehr starke Proliferation, von bis zu 50000 cpm induzieren konnten. Es ist zu sehen, dass bei einer Transfektion mit einer

geringeren Viruskonzentration (MOI 3) auch keine starke T-Zell-Proliferation zu erreichen war. Erst bei einer Konzentration von MOI 30 und MOI 300 konnte eine etwa gleich starke T-Zellantwort induziert werden. Dendritische Zellen, die mit Gräserallergen gepulst wurden, erreichten eine ähnlich starke Proliferation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (50000 cpm) wie die mit Ad-Phl p1 transfizierten dendritischen Zellen. Wurden dendritische Zellen mit Gräserallergen gepulst und Virus (Ψ5) transfiziert, konnte kein Adjuvanseffekt des Virus auf die T-Zellproliferation festgestellt werden. Die Proliferation der T-Zellen war außerdem titrierbar durch die Menge der eingesetzten dendritischen Zellen. In einem Verhältnis von 1:10 (1 DC, 10 T-Zellen) war die induzierte Proliferation am höchsten, wurde die Menge der dendritischen Zellen im Verhältnis 1:3 verringert, nahm auch die T-Zellproliferation ab (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7** Dendritische Zellen wurden wie in 2.1.5.2 beschrieben kultiviert, mit Psi 5 oder Ad-Phl p1 transfiziert oder mit 5µg Gräserallergen gepulst und zur Ausreifung gebracht. Autologe CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit diesen dendritischen Zellen primär stimuliert und nach 5 Tagen die Proliferation mittels <sup>3</sup>[H]-Thymidineinbau gemessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von insgesamt 8 durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die Mittelabweichungen dar. + zeigt die statistische Signifikanz (p = 0,01) verglichen mit dem Medium-Wert an.

## 5.2 Induktion einer Proliferation von autologen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch Allergen-DNA transfizierte dendritische Zellen



**Abb. 3.8** Dendritische Zellen wurden wie in 2.1.5.2 beschrieben kultiviert und an Tag 6 der Kultur entweder mit Ad-Phl p1 in verschiedenen Konzentrationen oder mit Psi 5 (MOI 300) transfiziert oder mit 5µg Gräserallergen gepulst. Nach 2 Tagen wurden die dendritischen Zellen mit autologen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen für 5 Tage kultiviert und die Proliferation mittels <sup>3</sup>[H]-Thymidineinbaus die Proliferation der T-Zellen gemessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von 8 durchgeführten Versuchen. Die Fehlerbalken stellen die Mittelabweichung dar. + zeigt die statistische Signifikanz (p = 0,01) verglichen mit dem Medium-Wert an.

Hier wurde untersucht, ob die mit Allergen-DNA transfizierten dendritischen Zellen auch bei autologen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen eine Proliferation induzieren können. Dazu wurden wie bei den Versuchen mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen als Negativkontrolle nicht-transfizierte (Medium) und mit Ψ5 transfizierte dendritische Zellen eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten wieder Gräserallergen-gepulste dendritische Zellen. In Abb. 3.8 ist zu sehen, dass auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch Allergen-DNA transfizierte dendritische Zellen zu einer starken Proliferation angeregt wurden. Hier war die Proliferation dieser Zellen sogar

stärker als die Proliferation der T-Zellen, die durch Protein-gepulste dendritische Zellen stimuliert wurden. Die dendritischen Zellen, die nicht transfiziert waren und die, die mit  $\Psi 5$  transfiziert wurden, ebenso wie mit  $\Psi 5$  und Gräserallergen gepulste Zellen, waren nicht in der Lage eine T-Zellproliferation zu induzieren. Auch hier konnte kein adjuvanter Einfluss des Virus auf die Proliferation gemessen werden, wenn die dendritischen Zellen mit Gräserallergen stimuliert waren. Mit Allergen-DNA transfizierte dendritische Zellen sind ebenfalls in der Lage in naiven  $CD8^+$ -T-Zellen eine starke Proliferation zu induzieren.

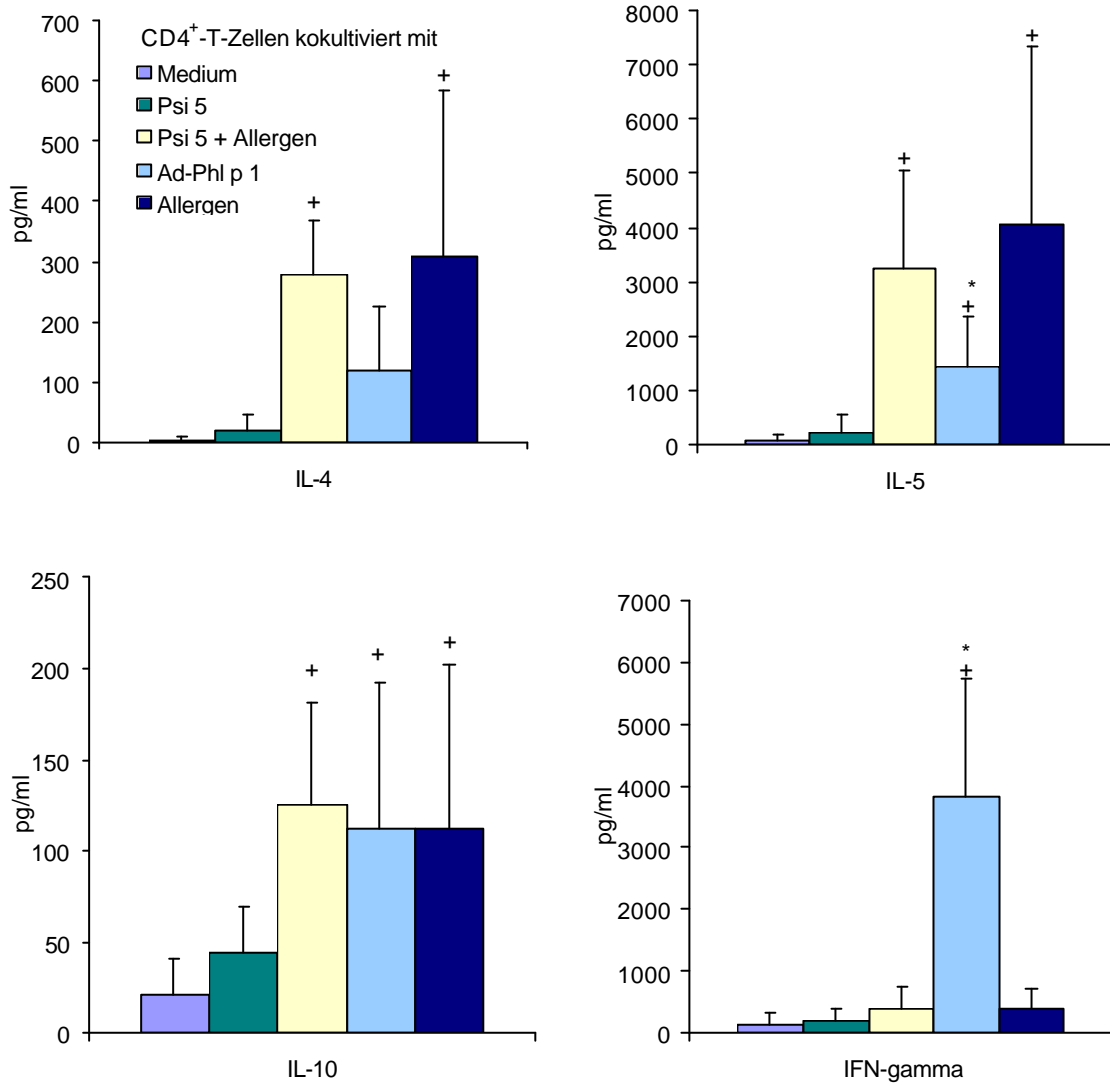
## **6. Zytokinproduktion der T-Zellen nach Stimulation mit adenoviral transfizierten dendritischen Zellen**

### **6.1 Zytokinproduktion der $CD4^+$ -T-Zellen**

Hier wurde das Zytokinmuster der  $CD4^+$ -T-Zellen, die durch Allergen-DNA transfizierte dendritische Zellen stimuliert wurden, untersucht. Die Zellen wurden wie in 2.1.5.2 beschrieben isoliert und kultiviert und die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IFN- $\gamma$  gemessen. Als Positivkontrolle dienten T-Zellen, die durch Gräserallergen-gepulste dendritische Zellen stimuliert waren und als Negativkontrolle T-Zellen, die mit dendritischen Zellen kokultiviert waren, die entweder mit  $\Psi 5$  transfiziert waren oder nicht transfiziert (Medium) waren. Um einen eventuellen adjuvanten Effekt des Virus  $\Psi 5$  auf Gräserallergen-gepulste dendritische Zellen und deren Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren, zu überprüfen, wurden so stimulierte dendritische Zellen mit T-Zellen kokultiviert. Es wurden jeweils  $5 \times 10^5$  T-Zellen und  $5 \times 10^4$  dendritische Zellen primär stimuliert und nach einer Woche mit frisch generierten dendritischen Zellen sekundär stimuliert. 24 h danach wurden die Zytokine mittels ELISA im Zellkulturüberstand gemessen (Abb. 3.9). Bei den  $T_H2$ -Zytokinen IL-4 und IL-5 ist im Vergleich von den mit pAd-Phl p1 transfizierten zu den mit Gräserallergen gepulsten dendritischen Zellen stimulierten T-Zellen eine Abnahme der Zytokinmenge gemessen worden. Die Negativkontrollen zeigten keine Zytokinproduktion. Außerdem konnte kein Unterschied bei der IL-10-Produktion der T-Zellen gemessen werden, wenn



diese mit Gräserallergen-gepulsten oder mit Allergen-DNA transfizierten dendritischen Zellen stimuliert wurden. Ebenso konnten mit  $\Psi 5$ -transfizierte und unbehandelte

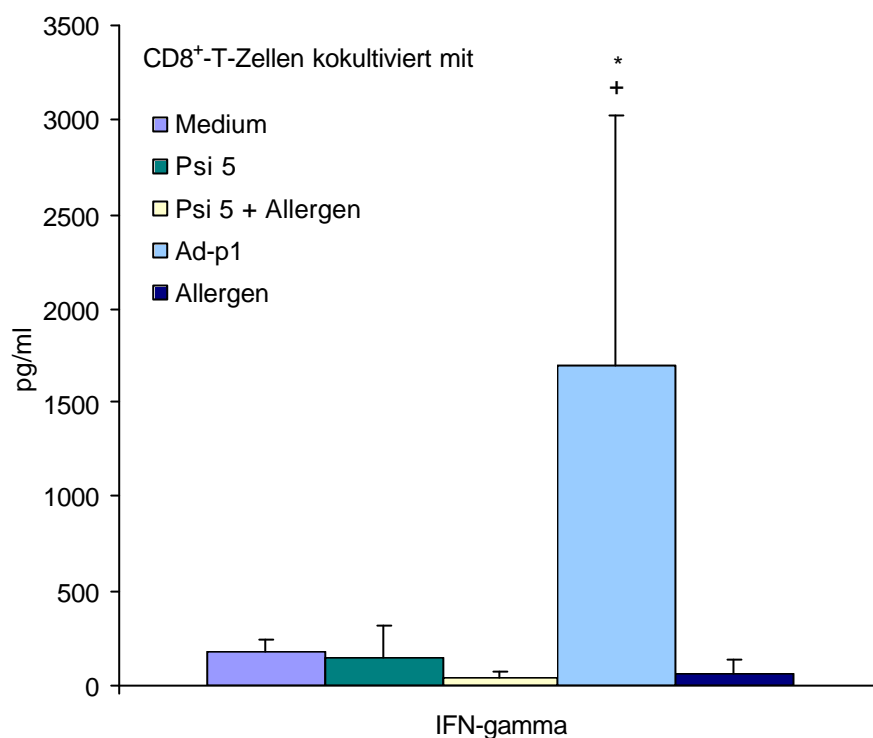


**Abb. 3.9** Dendritische Zellen wurden wie beschrieben kultiviert und mittels pAd-Phl p1 (MOI 300) oder  $\Psi 5$  (MOI 300) an Tag 6 transfiziert oder mit 5  $\mu\text{g}$  Gräserallergen gepulst. 48 h später wurden diese dendritischen Zellen mit autologen CD4<sup>+</sup>- T-Zellen im Verhältnis 1:10 kokultiviert. Nach einer Woche wurde die Kokultur mit frisch generierten dendritischen Zellen sekundär stimuliert und nach 24 h die Zytokinproduktion gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte von zwölf unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. <sup>+</sup> zeigt die statistische Signifikanz ( $p = 0,05$ ) verglichen mit dem Medium-Wert an. <sup>\*</sup> zeigt die statistische Signifikanz ( $p = 0,05$ ) verglichen mit dem Gräser-Wert an.

(Medium) dendritische Zellen nur eine geringe IL-10-Produktion induzieren. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass bei dem T<sub>H</sub>1-Zytokin IFN- $\gamma$  eine signifikante Zunahme der Zytokinproduktion zu beobachten war im Vergleich zu der Positivkontrolle, T-Zellen, die mit Gräserallergen-gepulsten dendritischen Zellen stimuliert wurden. Auch hier konnte bei den Negativkontrollen keine nennenswerten Mengen an IFN- $\gamma$  gemessen werden. Es konnte bei allen gemessenen Zytokinen kein adjuvanter Effekt des  $\Psi$ 5 auf die T-Zellen, die mit  $\Psi$ 5 transfizierten und Gräserallergen-gepulsten dendritischen Zellen stimuliert wurden, gemessen werden. Hier konnte also durch Allergen-DNA-transfizierte dendritische Zellen eine verstärkte Produktion des T<sub>H</sub>1-Zytokins IFN- $\gamma$  und eine schwächere Produktion der T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4 und IL-5 induziert werden.

### **6.2 Zytokinproduktion der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen**

In Abb. 3.10 ist die Zytokinproduktion der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu sehen. Es konnte nur IFN- $\gamma$  gemessen werden, die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 lagen unter dem Detektionslimit. Als Negativkontrolle dienten T-Zellen, die mit  $\Psi$ 5 transfizierten oder mit nicht transfizierten dendritischen Zellen (Medium) kokultiviert wurden. Dendritische Zellen, die mit Gräserallergen gepulst waren und mit  $\Psi$ 5 transfiziert wurden, dienten zur Kontrolle, ob das Virus einen Ajuvanseffekt ausübt. T-Zellen, die durch Gräserallergen-gepulste dendritische Zellen stimuliert wurden, wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Bei den T-Zellen, die mit Ad-Phl p1 transfizierten dendritischen Zellen stimuliert waren, nahm die Produktion von IFN- $\gamma$  signifikant zu. Im Gegensatz dazu konnte bei den Negativkontrollen und der Positivkontrolle nur geringe Mengen an IFN- $\gamma$  induziert werden. Durch den Einsatz von Allergen-DNA-transfizierten dendritischen Zellen konnte hier, genauso wie bei den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, eine verstärkte Produktion des T<sub>H</sub>1-Zytokins IFN- $\gamma$  induziert werden.

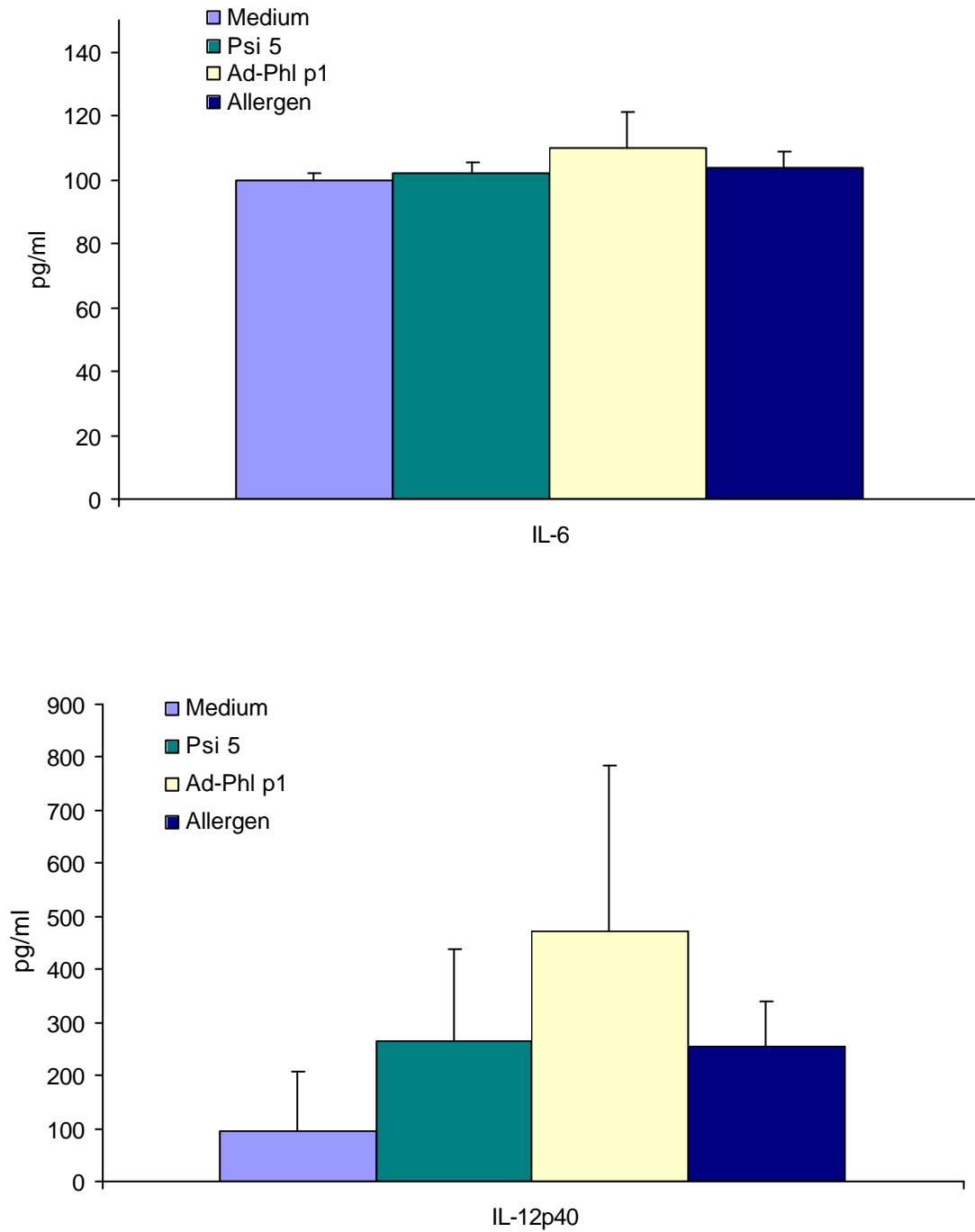


**Abb. 3.10** Dendritische Zellen wurden wie beschrieben kultiviert und mittels pAd-Phl p1 (MOI 300) oder  $\Psi$ 5 (MOI 300) an Tag 6 transfiziert oder mit 5  $\mu$ g Gräserallergen gepulst. 24 h später wurden diese dendritischen Zellen mit autologen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Verhältnis 1:10 kokultiviert. Nach einer Woche wurde die Kokultur mit frisch generierten dendritischen Zellen sekundär stimuliert und nach 48 h die Zytokinproduktion gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte von acht unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. + zeigt die statistische Signifikanz ( $p = 0,01$ ) verglichen mit dem Medium-Wert an. \* zeigt die statistische Signifikanz ( $p = 0,01$ ) verglichen mit dem Gräser-Wert an.

## 7. Zytokinproduktion der eingesetzten dendritischen Zellen

### 7.1 IL-6- und IL-12p40-Produktion von unreifen dendritischen Zellen

Um zu überprüfen, ob die adenovirale Transfektion das Zytokinmuster der dendritischen Zellen beeinflusst, wurde von mit  $\Psi$ 5 und mit Allergen-DNA transfizierten, sowie von nicht-transfizierten, mit Gräserallergen gepulsten und ungepulsten unreifen dendritischen Zellen 48 h nach der Zugabe der Allergene bzw. der Transfektion, Zellkulturüberstände abgenommen und im ELISA die IL-12 p40- und IL-6-Produktion dieser Zellen gemessen (Abb. 3.11)



**Abb. 3.11** Zytokinproduktion von unreifen dendritischen Zellen  
Dendritischen Zellen wurden wie in 2.1.5.2. beschrieben generiert und entweder adenoviral transfiziert oder mit Allergen gepulst. Die Abbildung zeigt Mittelwerte von jeweils vier durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die Mittelabweichung dar.

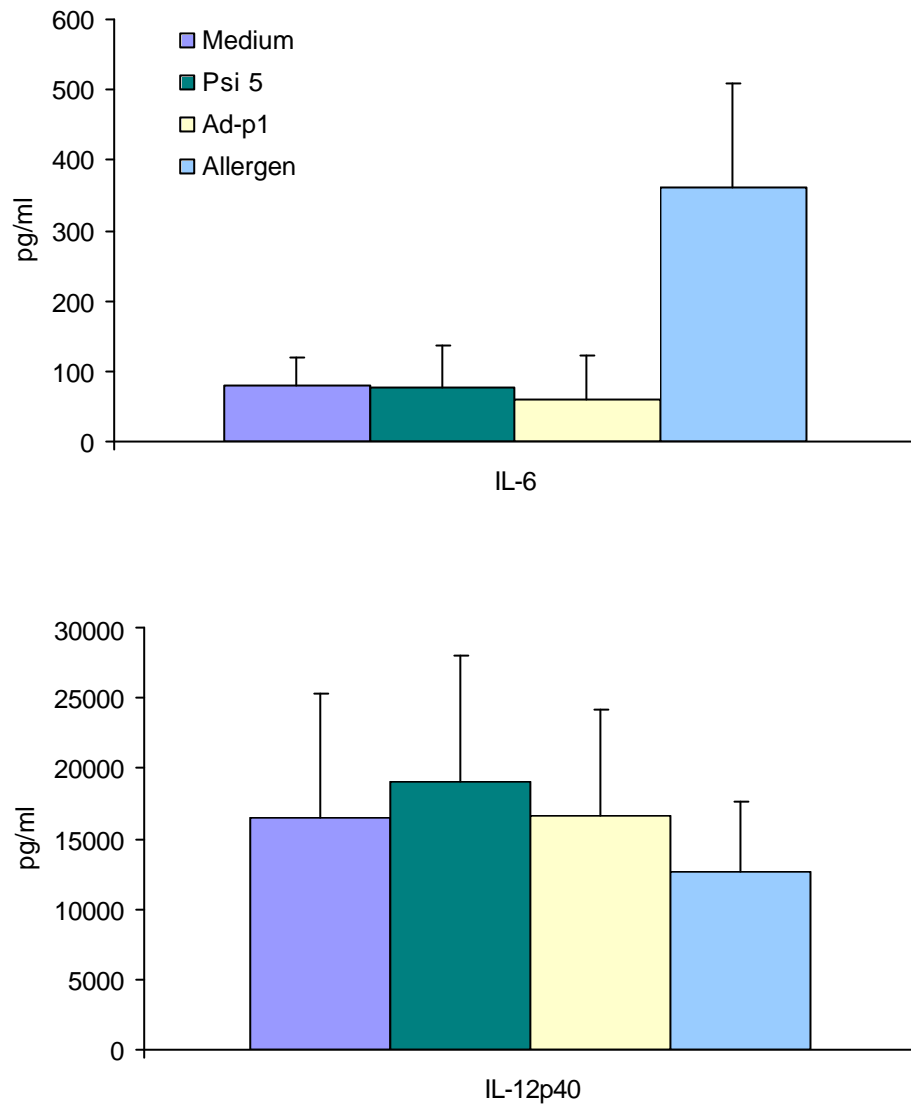
Alle dendritischen Zellen, unabhängig davon wie sie behandelt wurden, sekretierten geringe Mengen des Zytokins IL-6.

Das Zytokin IL-12 p40 wurden am stärksten, wenn auch nicht signifikant von Allergen-DNA transfizierten dendritischen Zellen produziert. Mit  $\Psi$ 5 transfizierte und Allergen-gepulste Zellen zeigten keinen Unterschied in der IL-12 p40-Sekretion.

### ***7.2 IL-6- und IL-12p40-Produktion von reifen dendritischen Zellen***

Von reifen dendritischen Zellen wurde 48h nach Stimulation mit entweder Allergen oder nach Transfektion mit Adenovirus die Zellkulturüberstände abgenommen und die Zytokinmengen mittels ELISA gemessen. Dendritischen Zellen, die mit Allergen stimuliert wurden, sekretierten große Mengen IL-6. Alle anderen Zellen produzierten gleiche Mengen des Zytokins.

Bei der Messung der IL-12 p40-Produktion konnten bei den verschiedenen Ansätzen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 3.12)



**Abb. 3.12** Zytokinproduktion von reifen dendritischen Zellen

Die dendritischen Zellen wurden wie in 2.1.5.2 beschrieben generiert und 48 h nach Stimulation in Anwesenheit des Zytokincocktails oder Transfektion die Zellkulturüberstände abgenommen und die Zytokinmengen mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung stellt Mittelwerte von 4 durchgeführten Experimenten dar. Die Fehlerbalken zeigen die Abweichung.

## IV. Diskussion

Heutzutage reagieren fast 20 % der Bevölkerung auf eigentlich harmlose Antigene mit einer allergischen Reaktion. Diese findet aber erst nach dem zweiten Kontakt mit dem Allergen statt, bei der ersten Begegnung kommt es zu einer Sensibilisierung. Bei den meisten atopisch-allergischen Krankheiten wie allergische Rhinitis, Asthma bronchiale oder atopisches Ekzem werden IgE-Antikörper gegen die Allergene gebildet. Das IgE bindet an die hochaffinen Fcε-Rezeptoren auf Mastzellen. Diese werden durch eine Kreuzvernetzung des Rezeptors aktiviert und sezernieren Mediatoren, die unter anderem eine Gefäßerweiterung, die Kontraktion der glatten Muskulatur und eine vermehrte Schleimproduktion zur Folge haben. Durch die Mediatoren werden aber auch andere Immunzellen angezogen, wie Eosinophile und Basophile, welche die allergische Reaktion dann verstärken (42;81). Die eigentliche physiologische Funktion dieser Abwehrreaktionen besteht in der Bekämpfung von Parasiten. Da diese in Industrienationen jedoch nur selten vorkommen, wird vermutet, dass das Immunsystem als Kompensation auf harmlose Antigene reagiert. Dadurch lässt sich eventuell auch die genetische Prädisposition erklären, die in Ländern mit Parasiten einen Überlebensvorteil darstellt.

Der für diese allergischen Reaktionen verantwortliche Antikörperisotyp ist das IgE, dessen Bildung vor allem durch das Zytokin IL-4 induziert wird. IL-4 wiederum wird von T<sub>H</sub>2-Zellen gebildet. Als Gegenspieler des IL-4 tritt das Zytokin IFN-γ auf, das von T<sub>H</sub>1-Zellen ausgeschüttet wird. Beide Zytokine können die Produktion des anderen unterdrücken. Auf diese Weise stellt sich ein Gleichgewicht zwischen einer T<sub>H</sub>1- und einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort ein. Bei Atopikern ist das Gleichgewicht zugunsten einer T<sub>H</sub>2-Antwort verschoben.

Hier setzt auch die spezifische Immuntherapie an, die durch ansteigende Injektion des Allergens die Immunantwort in Richtung einer T<sub>H</sub>1-Dominanz verschiebt, mit einer verstärkten IFN-γ und einer verminderten IL-4-Produktion (52-54). Außerdem wird vermehrt das Zytokin IL-10 gebildet, das regulatorische Eigenschaften hat (53). Nachteile der spezifischen Immuntherapie sind der lang andauernde Zeitraum der

Therapie und die Gefahr, dass es zu einem anaphylaktischem Schock kommen kann (55).

Deshalb werden Alternativen gesucht, bei denen solche Nebenwirkungen nicht auftreten und die Wirksamkeit gesteigert ist. Dabei ist die Antigen-spezifische Modifikation der allergischen Immunantwort auf T-Zell-Ebene ein attraktives Ziel für immunotherapeutische Beeinflussungen. *Raz et al.* beschrieb als erster, dass Plasmid-DNA-Immunisierungen in Mäusen vorrangig eine  $T_H1$ -dominierte Immunantwort hervorrufen und eine  $T_H2$ -Antwort hemmen (82), in dem sie die Produktion von  $IFN-\gamma$ , nicht aber von IL-4 und IL-5 stimulieren. Die Mäuse, die mit Proteinen immunisiert wurden, produzierten IL-4 und IL-5 (83). Werden bei Immuntherapien, die auf Proteinen basieren als Adjuvans immunstimulatorische Sequenzen (ISS-ODN bzw. CpG-Motive) zugegeben, wird eine  $T_H1$ -dominierte Immunantwort induziert (83). CpG-Motive haben großen Anteil an unmethylierten Cytosin-Guanin-Dinukleotiden und imitieren bakterielle Sequenzen. Dadurch können sie eine  $T_H1$ -Antwort stimulieren (84). Wahrscheinlich wirken solche Adjuvantien aktivierend auf antigenpräsentierende Zellen, speziell auf dendritische Zellen (85). *Hochreiter et al.* konnten zeigen, dass eine Protein-Immunisierung und eine Vakzinierung mittels Gene-Gun des Birkenpollenallergens Bet v1 alleine eine  $T_H2$ -dominierte Immunantwort induziert, bei Zugabe von CpG-Motiven aber wurde eine Antigen-spezifische  $T_H1$ -Antwort festgestellt (57). Der Effekt der immun-stimulatorischen Sequenzen variiert abhängig von der Natur des Antigens, den Bedingungen der Immunisierung sowie der zu behandelnden Spezies. So wurde ein klarer Effekt in Mäusen beobachtet, die mit  $\beta$ -Galaktosidase und ISS-ODN vakziniert wurden, aber nicht bei einer Impfung mit Bet v1 und dem Lieschgraspollen-Allergen Phl p 2. Außerdem war die hervorgerufene Immunantwort nicht Antigen-spezifisch (57). Die DNA-Vakzinierungen sind jedoch effizienter in der Verschiebung des  $T_H1$ - $T_H2$ -Gleichgewichts als die Protein-Immuntherapien. Außerdem besteht bei Anwendung einer DNA-basierten Immuntherapie nicht das Risiko, einen anaphylaktischen Schock zu induzieren (86). Schließlich konnte gezeigt werden, dass bei einer Immunisierung von Mäusen mit adenoviral transfizierten dendritischen Zellen ein Shift von einer  $T_H2$ - zu einer  $T_H1$ -Immunantwort induziert werden konnte mit verstärkter  $IFN-\gamma$ -Produktion der  $CD8^+$ -T-Zellen. Des Weiteren konnte dadurch die Produktion von spezifischen IgE gehemmt



werden (63). Immunisierungen mit adenoviral transfizierten dendritischen Zellen werden bereits in der Tumorthherapie eingesetzt (87;88). Dabei wird ein Peptid eines Tumors in die dendritischen Zellen transfiziert. Dadurch kann eine starke zelluläre Immunantwort stimuliert werden, einhergehend mit einer Abstoßung des Tumors. Der Einsatz von Allergen-DNA-Vakzinen im Mausmodell hat gezeigt, dass sie sehr effektiv die Immunantwort beeinflussen können, vor allem weil sie eine  $T_H2$ -Antwort zugunsten einer  $T_H1$ -dominierten Immunantwort verändern können. Des Weiteren sind dendritische Zellen sehr gut geeignet zur antigen-spezifischen Modifikation, durch ihre potente Antigenpräsentation und die Fähigkeit selbst naive T-Zellen zu stimulieren. Die adenovirale Transfektion ist transient, dieser Nachteil wird durch die stabile Präsentation des Antigens auf der Oberfläche der dendritischen Zellen bis zu ihrem Zelltod ausgeglichen. Außerdem kann man durch die Präsentation des Antigens mittels dendritischer Zellen umgehen, dass spezifische IgE-Moleküle die  $Fc\epsilon$ -Rezeptoren kreuzvernetzen und so Mastzellen aktivieren, weil das Allergen in Peptide zerlegt, eingebunden ist in den MHC-Komplex der dendritischen Zelle und so nicht mehr von IgE-Molekülen gebunden werden kann. Durch die Transfektion und die dadurch einhergehende endogene Präsentation des Allergens könnte dieser Effekt noch verstärkt werden.

Als Vektor zur Transfektion eignen sich bei dendritischen Zellen besonders gut Adenoviren. Andere nicht-virale Transfektionsmethoden sind bei dendritischen Zellen nicht erfolgreich (64;89). In vorherigen Experimenten hatten wir versucht, dendritische Zellen mittels Lipofektion, Elektroporation und balistomagnetischen Transfer mit Allergen-DNA zu transfizieren. Mit diesen Methoden ließen sich die dendritischen Zellen zu maximal 3% erfolgreich transfizieren. Aus diesem Grund wurde die Methode der viralen Transfektion angewandt. *Arthur et al.* analysierten auch verschiedene Transfektionsmethoden und konnten dendritische Zellen mit einem Adenovirus sehr gut transfizieren. Allerdings wurden sehr hohe Viruskonzentrationen benötigt und die dendritischen Zellen exprimierten nach Transfektion nicht die für sie typischen Oberflächenmarker (90). Bei der hier angewandten Methode, die noch unreife dendritische Zellen transfiziert, ist eine sehr gute Effizienz zu erreichen und die Zellen weisen die typischen Oberflächenmarker (CD80, CD83, CD86) auf (64;91). Ein Problem bei dem Einsatz von Adenoviren ist die Möglichkeit der Antikörperbildung

gegen Viruspartikel (89;92). Diese Gefahr könnte durch dendritische Zellen umgangen werden, da das Virus internalisiert wird und so die direkte Exposition viraler Partikel verhindert wäre (64). Auch durch die in dieser Arbeit angewandten *ex-vivo* Transfektion der dendritischen Zellen könnte die Bildung von Antikörpern gegen das Virus möglicherweise umgangen werden (93). Im Vergleich zu anderen Viren als Vektor sind Adenoviren eindeutig vorzuziehen. Lentiviren und auch Retroviren sind nicht in der Lage, nicht-teilende Zellen zu transfizieren und sind damit auch nicht geeignet für die Transfektion dendritischer Zellen. Um hohe Transfektionseffizienzen zu erreichen, müssen hohe Viruskonzentrationen eingesetzt werden. Der Vorteil von modifizierten Adenoviren ist, dass sie replikationsdefizient gemacht werden können, und sich dadurch nicht in den infizierten Zellen vermehren können. Sie sind in der Lage bis zu 7,5 kb Fremd-DNA in ihr Genom zu integrieren (94). Die Aufnahme des Adenovirus in die Wirtszelle erfolgt über  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin, das auf unreifen dendritischen Zellen in großen Mengen exprimiert wird. Außerdem lassen sich mit Adenoviren sehr hohe Transfektionsraten von über 90% erreichen (89).

In dieser Arbeit wurde die Frage bearbeitet, ob es möglich ist, durch den Einsatz von Allergen-DNA-transfizierten dendritischen Zellen eine bereits bestehende, humane,  $T_H2$ -dominierte allergische Immunantwort in eine  $T_H1$ -dominierte Immunantwort *in vitro* zu verändern. Dazu wurden dendritische Zellen mit einem replikationsdefizienten Adenovirus, der für das Allergen des Lieschgraspollens Phl p 1 kodiert, transfiziert und deren Wirkung auf die Proliferation und die Zytokinexpression von autologen  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Zellen untersucht.

Zuerst wurde die Transfektionseffizienz kontrolliert, wofür unreife dendritische Zellen mit einem Adenovirus, das für das Protein EGFP kodiert, transfiziert wurden, weil die Expression des EGFP sehr gut im Durchflußzytometer bestimmt werden kann. Mit steigender Viruskonzentration nahm auch die Transfektionseffizienz zu, bei einer Viruskonzentration von MOI 300 lag die Transfektionsrate bei 92%. Die Viabilität der dendritischen Zellen wurde dadurch aber nicht beeinträchtigt, was mittels Trypanblaufärbung im Mikroskop gezeigt werden konnte. Dies passt zu den Ergebnissen, die *Zhong et al.* gezeigt haben, dass Adenoviren effiziente, nicht störende

Vektoren für dendritische Zellen sind. d.h. dass sie weder die Ausreifung noch die biologische Aktivität beeinflussen (64).

Um zu kontrollieren, ob die transfizierte dendritische Zelle in ihrer Morphologie oder in ihrem Phänotyp verändert ist, wurde die Expression der Oberflächenmarker CD80, CD83, CD86, MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II kontrolliert. Es konnte gezeigt werden, dass sich in der Expression dieser Marker kein Unterschied ergibt zwischen transfizierten und nicht-transfizierten dendritischen Zellen. Auch die Morphologie blieb nach Transfektion unverändert, es waren im Mikroskop sehr schön die ausgebildeten Dendriten der reifen dendritischen Zellen zu sehen. Die Fähigkeit, Antigene zu präsentieren, sollte also nicht gestört worden sein durch die virale Transfektion. Nachdem im Durchflußcytometer und im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen wurde, dass das Protein EGFP exprimiert wird, wurde ein Western Blot durchgeführt, um zu untersuchen, ob auch das Protein Phl p1 nach Transfektion von den dendritischen Zellen mit der dazugehörigen DNA exprimiert wird. Da eine Bande, mit Hilfe eines für Phl p 1 spezifischen Antikörpers, bei 35 kDa (Molekulargewicht von Phl p 1) detektiert wurde, war sichergestellt, dass sich die dendritischen Zellen effizient transfizieren lassen und das Allergen auch exprimieren.

Auch die Fähigkeit der dendritischen Zellen, Antigene zu präsentieren und durch die Expression der kostimulatorischen Moleküle T-Zellen zur Proliferation anzuregen, konnte nachgewiesen werden. Die mit Allergen-DNA transfizierten Zellen wurden dazu in einer Kokultur mit autologen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen eingesetzt und die Proliferation dieser mittels eines Proliferationsassays gemessen. Dabei konnte eine starke Proliferation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach Stimulation durch mit Allergen-DNA transfizierte dendritische Zellen gemessen werden. Zur Kontrolle, welche Wirkung das Virus alleine hat, wurden dendritische Zellen nur mit dem Adenovirus  $\Psi$ 5 transfiziert und damit T-Zellen stimuliert. Hier konnte keine erhöhte Proliferation gemessen werden, was beweist, dass die Proliferation der mit Allergen-DNA transfizierten dendritischen Zellen stimulierten T-Zellen nur auf das Allergen zurückzuführen ist und nicht auf virale Proteine. Die Tatsache, dass die Proliferation bei ansteigender Viruskonzentration zunimmt, unterstützt dieses Ergebnis. Die gemessene T-Zell-Proliferation war in etwa genauso stark wie die der T-Zellen, die durch Allergen-

gepulste dendritische Zellen induziert wurde. Sehr ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei den Proliferationsassays mit CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Diese sind *in vitro* sehr schlecht zu einer Proliferation anzuregen, d.h. dass die Proliferationswerte niedriger ausfallen, als bei CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Durch die Allergen-DNA transfizierten dendritischen Zellen jedoch konnte eine starke Proliferation der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen induziert werden, die viel höher war, als die der T-Zellen, die durch Allergen-gepulste dendritische Zellen stimuliert wurden. Daraus lässt sich schließen, dass dendritische Zellen das Allergen Phl p1 nach Transfektion sowohl über den MHC-Klasse-I-Komplex präsentieren und damit die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ansprechen, als auch über den MHC-Klasse-II-Komplex und dadurch die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen stimulieren. Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Erkenntnissen, dass dendritische Zellen Antigene über den MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Komplex präsentieren (95). Auch nach einer Virusinfektion präsentieren dendritischen Zellen die viralen Peptide sowohl auf MHC-Klasse-I- als auch auf Klasse-II-Molekülen, somit kann jede von einem Virus infizierte dendritische Zelle naive CD8<sup>+</sup>- sowie CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aktivieren (96). Im Gegensatz zu einer Protein-induzierten Immunantwort stimuliert die DNA-Vakzinierung sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort (95).

Zur Bestimmung des Zytokinmusters der T-Zellen wurden Kokulturen angesetzt, in denen entweder CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit Allergen-DNA-transfizierten dendritischen Zellen kultiviert wurden. Um Zytokine messen zu können, speziell IL-4, mussten die Kokulturen nach einer Woche mit frisch generierten dendritischen Zellen sekundär stimuliert werden. Nach 24 Stunden wurden dann die Zellkulturüberstände abgenommen und die Zytokinmengen im ELISA bestimmt. Es konnte bei den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die durch Allergen-DNA-transfizierte dendritische Zellen stimuliert wurden, eine Abnahme der Zytokine IL-4 und IL-5 gemessen werden, im Vergleich zu T-Zellen, die mit Allergen-gepulsten dendritischen Zellen aktiviert wurden. Diese Zytokine sind typisch für eine T<sub>H</sub>2-dominierte Immunantwort. IL-4 initiiert die Transkription typischer Transkriptionsfaktoren für T<sub>H</sub>2-Immunantworten, die wiederum in autokriner Weise die Transkription von IL-4 und auch von IL-13 verstärken (97;98). Die Reduktion des IL-5 ist wichtig, da im Mausmodell gezeigt werden konnte, dass es nicht ausreichend ist, die IL-4-Produktion zu reduzieren, sondern dass es erforderlich ist,

zusätzlich auch die IL-5-Produktion zu unterbinden (99). Die gemessenen Werte des Zytokins IL-10 waren bei T-Zellen, die durch dendritische Zellen, welche mit Gräserallergen-gepulst oder mit Ad-Phl p1 transfiziert wurden, gleich hoch. Dieses Zytokin, das sowohl von  $T_H1$ - als auch von  $T_H2$ -Zellen produziert wird (100;101), gilt als regulatorisches Zytokin. Es wird vor allem nach Kontakt mit Bestandteilen der Bakterienzellwand, Parasiten und Viren induziert (102-104). Es ist involviert in der Inhibition auch von  $T_H2$ -dominierten allergischen Immunantworten (105), vor allem durch seinen blockierenden Effekt auf die Produktion von IgE und IL-5. Das  $T_H1$ -Zytokin IFN- $\gamma$  wurde nach Aktivierung der T-Zellen mit transfizierten dendritischen Zellen in signifikant erhöhter Dosis gemessen. Auch hier wurden zur Kontrolle der Wirkung des Virus dendritische Zellen mit  $\Psi 5$  transfiziert und dann T-Zellen stimuliert. Hier konnten kaum Zytokinmengen gemessen werden, die Mengen waren ungefähr vergleichbar mit denen der Negativkontrolle (T-Zellen die durch reife dendritische Zellen, die keine weiteren Stimuli erhalten haben, aktiviert wurden).

Bei den Messungen der Zytokine, die von  $CD8^+$ -T-Zellen produziert wurden, konnte nur IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden. Die Menge an IFN- $\gamma$  war nach Stimulation der T-Zellen mit transfizierten dendritischen Zellen auch hier signifikant erhöht, im Vergleich zu T-Zellen, die durch Allergen-gepulste dendritische Zellen aktiviert wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nach Transfektion der dendritischen Zellen mit Allergen-DNA von diesen eine verstärkte  $T_H1$ -Zytokinproduktion in T-Zellen induziert wird und dass die Menge an den  $T_H2$ -Zytokinen IL-4 und IL-5 abnimmt. Durch die adenovirale Transfektion konnte also eine Verschiebung der Immunantwort in Richtung einer  $T_H1$ -dominierten induziert werden.

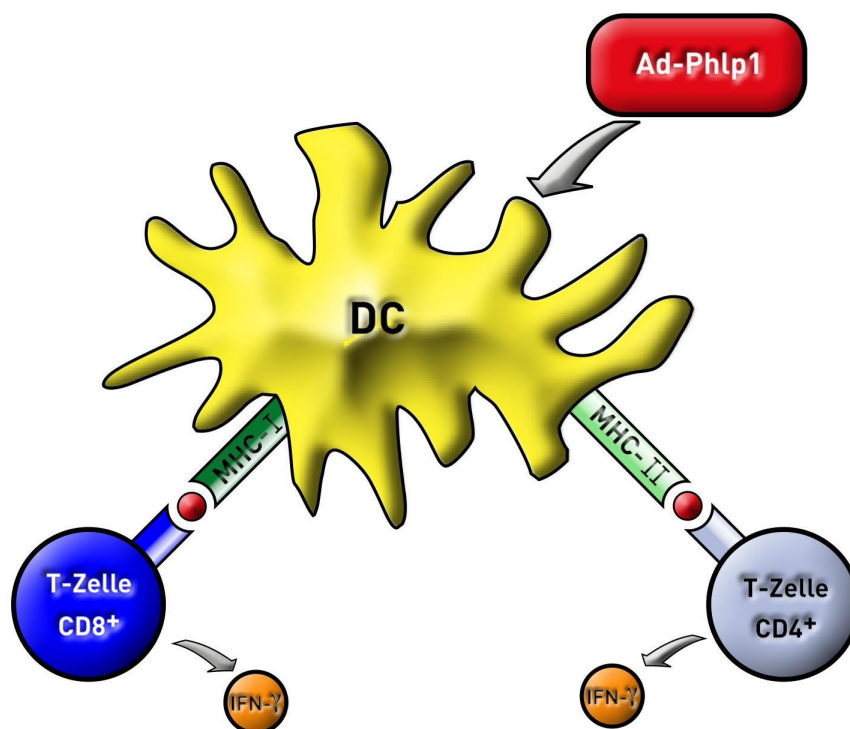
Als nächsten wurde überprüft, ob die adenoviral transfizierten dendritischen Zellen selbst ein verändertes Zytokinmuster haben, durch das sie die T-Zellen beeinflussen. Dazu wurde von reifen, transfizierten und zur Kontrolle von nicht-transfizierten dendritischen Zellen Zellkulturüberstände abgenommen und mittels ELISA die Zytokinmengen der Zytokine IL-6 und IL-12 bestimmt. IL-6 wird unter anderem von antigenpräsentierenden Zellen produziert und nimmt Einfluss auf die frühe Entwicklung der T-Zellen. Es induziert im Maussystem eine  $T_H2$ -dominierte Immunantwort und unterdrückt eine  $T_H1$ -dominierte Antwort (106;107), während IL-12 das Zytokin ist, das von antigenpräsentierenden Zellen ausgeschüttet, wenn eine  $T_H1$ -Immunantwort

dominiert (108;109). Es besteht aus den zwei Proteinketten p40 und p35, die zusammen das bioaktive Molekül IL-12 p70 bilden (5). IL-12 p40 wird im Gegensatz zu IL-12 p35 auch als Monomer oder Dimer sezerniert (5-7). Da dendritische Zellen zur IL-12p70-Produktion zusätzliche Stimuli, wie Interaktion mit dem CD40-Liganden der T-Zellen oder Lipopolysaccharid (LPS) benötigen (8;110) und die IL-12 p70-Produktion zu gering war, um Unterschiede zwischen den verschiedenen DC-Behandlungen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit nur IL12 p40 gemessen.

In Mausmodellen konnte eine IL-12 unabhängige IFN- $\gamma$ -Produktion auch schon von anderen Gruppen gezeigt werden (111-113). *Stämpfli et al.* z.B. zeigten, dass eine virale Infektion, speziell mit einem Adenovirus, eine Antigen-induzierte T<sub>H</sub>2-dominierte allergische Reaktion inhibiert. Hierbei scheint die IFN- $\gamma$ -Produktion die entscheidende Rolle zu spielen. So konnte bei IFN- $\gamma$ -knock-out-Mäusen die Inhibition der allergischen Reaktion nicht beobachtet werden. Wurden dagegen IL-12-knock-out-Mäuse mit einem Virus infiziert und gleichzeitig versucht eine allergische Reaktion zu induzieren, so wurde diese inhibiert. Die Verhinderung einer allergischen Reaktion war also eindeutig auf die Wirkung von IFN- $\gamma$  zurückzuführen und nicht auf IL-12 (114).

Die reifen dendritischen Zellen sekretierten nur dann viel IL-6, wenn sie mit Allergengepulst waren. Bei adeno viral transfizierte Zellen konnten, verglichen mit der Negativgruppe (Medium) keine veränderten Mengen an IL-6 gemessen werden. Die reifen dendritischen Zellen produzierten große Mengen an IL-12 p40. Es ergaben sich aber keine signifikanten Unterschiede bei den sezernierten Mengen an IL-12 bei transfizierten und nicht-transfizierten dendritischen Zellen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass durch den Ausreifungscocktail, der aus PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  besteht, eine starke IL-12-Produktion induziert wird und dadurch keine Veränderungen mehr in den Mengen gemessen werden konnten. Aus diesem Grund haben wir anschließend die IL-12 p40-Produktion von unreifen dendritischen Zellen untersucht. Die Zellen wurden an Tag 6 der Kultur mit den verschiedenen Stimuli behandelt, erhielten aber nicht den Ausreifungscocktail. Bei unreifen dendritischen Zellen konnten keine Unterschiede in der IL-6-Produktion gemessen werden. Im Gegensatz dazu konnte bei Allergen-DNA-transfizierten unreifen dendritischen Zellen eine erhöhte IL-12 p40-Menge gemessen werden. Bei  $\Psi$ 5-transfizierten dendritischen Zellen wurde kein Unterschied zu

Gräserallergen-gepulsten Zellen festgestellt. Diese Ergebnisse entsprechen eigentlich den Erwartungen, da IL-12  $T_H1$ -Antworten induziert. Hier handelt es sich aber um unreife dendritische Zellen, in den Experimenten dieser Arbeit wurden aber ausschließlich reife dendritische Zellen eingesetzt. Bei diesen konnte aber, wie bereits erwähnt, keine Veränderung der IL-12 p40-Sekretion gemessen werden. Daher bestätigen die hier vorliegenden Ergebnisse die Arbeit von *Stämpfli et al.* die zeigen konnten, dass bei Mäusen eine adenovirale Infektion eine allergische Reaktion unterdrückt und dass dieser Effekt auch bei IL-12-knock-out-Mäusen vorkommt. Die Produktion und Sekretion von IL-12 hat also keinen essentiellen Einfluss auf die Verschiebung einer  $T_H2$ - zu einer  $T_H1$ -dominierten Immunantwort. Der Effekt ist aber notwendig mit der Präsenz von IFN- $\gamma$  verknüpft (114).



**Abb. 4.1** Einfluss von Ad-Phl p1 auf dendritische Zellen und deren Wirkung auf T-Zellen  
Nach Transfektion der dendritischen Zelle mit Ad-Phl p1 und Kokultur mit T-Zellen wird bei  $CD4^+$ -T-Zellen eine verringerte IL-4- und IL-5-Produktion induziert, sowie eine verstärkte IFN- $\gamma$ . Auch bei  $CD8^+$ -T-Zellen wird eine signifikant erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion induziert,

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass durch die adenovirale Transfektion dendritische Zellen sehr effizient mit Allergen-DNA transfiziert werden können, dass sich ihre Viabilität, Morphologie und die Expression der Oberflächenmarker nicht ändert und dass sie das korrespondierende Protein exprimieren. Sie können nach Transfektion mit Allergen-DNA T-Zellen sehr gut zu einer Proliferation auf das Allergen anregen, vor allem CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die stärker proliferieren, als nach Stimulation mit Allergenprotein-gepulsten dendritischen Zellen. Desweiteren konnte eine niedrigere Produktion der T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4 und IL-5 und eine gesteigerte Produktion des T<sub>H</sub>1-Zytokins IFN- $\gamma$  gezeigt werden, wenn die T-Zellen durch Allergen-DNA-transfizierte dendritische Zellen aktiviert wurden. Durch den Einsatz transfizierter dendritischer Zellen konnte eine Verschiebung der humanen allergischen Immunantwort zugunsten einer T<sub>H</sub>1-dominierten Antwort induziert werden (Abb. 4.1).



## V. Literaturverzeichnis

1. Ezekowitz RAB. Innate Immunity. *Curr Op Immunol* 1998; 10: 9-53.
2. Metchnikoff E. *Immunity in infectious diseases*, 1.Auflage ed. New York: Macmillan Press, 1995.
3. Bjorkman PJ, Saper MA, Samaraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987; 329: 512-8.
4. Mosman TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
5. Trinchieri G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int Rev Immunol* 1998; 16: 365-96.
6. Trinchieri G, Scott P. The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy [see comments]. *Immunol Today* 1994; 15: 460-3.
7. Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol Today* 1993; 14: 335-8.
8. Snijders A, Kalinski P, Hilkens CM, Kapsenberg ML. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol* 1998; 10: 1593-8.
9. Schlegel HG. *Die Zelle und ihre Struktur. Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart: Thieme, 1992;17-88.
10. Verhasselt V, Buelens C, Willems F, De Groote D, Haeffner Cavaillon N, Goldman M. Bacterial lipopolysaccharides stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J Immunol* 1997; 158: 2919-25.
11. Kopp EB, Medzhitv R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 1999; 11: 13-8.
12. Medzhitv R, Janeway Cjr. The toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology* 2000; 8: 452-6.
13. Snapper CM, Paul WE. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987; 236: 944-7.

14. Coffman RL, Ohara J, Bond MW, Carty J, Zlotnik A, Paul WE. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J Immunol* 1986; 136: 4538.
15. Yssel H, De Waal Malefyt R, Roncarolo MG, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H, De Vries J. IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *J Immunol* 1992; 149: 2378-84.
16. Swain SL. CD4 T cell development and cytokine polarization: an overview. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 795-8.
17. Mosman TR, Sad S. The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 142-6.
18. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med* 1974; 139: 1431-45.
19. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137: 1142-62.
20. Steinman RM, Swanson J. The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 1995; 182: 283-8.
21. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995; 182: 389-400.
22. Engering AJ, Cella M, Fluitsma D, Brockhaus M, Hoefsmit EC, Lanzavecchia A, Pieters J. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997; 27: 2417-25.
23. Bluestone JA. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity* 1995; 2: 555-9.
24. Makgoba MW, Sanders ME, Ginther Luce GE, Dustin ML, Springer TA, Clark EA, Mannoni P, Shaw S. ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependant adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature* 1988; 331: 86-8.
25. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999; 397: 263-6.
26. Hofer MF, Jirapongsananuruk O, Trumble AE, Leung DY. Upregulation of B7.2 but not B7.1, on B cells from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 96-102.

27. Ozawa H, Aiba S, Nakagawa, Tagami H. Interferon-gamma and Interleukin-10 inhibit antigen presentation by Langerhans cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7.1) expression. *Eur J Immunol* 1996; 26: 648-52.
28. Bashian GG, Braun CM, Huang SK, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Essayan DM. Differential regulation of human, antigen specific Th1 and Th2 responses by the B-7 homologues, CD80 and CD86. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 235-42.
29. Flicker S, Steinberger P, Norderhaug L, Sperr WR, Majilesi Y, Valent P, Kraft D, Valenta R. Conversion of grass-pollen allergen-specific human IgE into a protective IgG1 antibody. *Eur J Immunol* 2003; 32: 2156-62.
30. Pirquet Cv. Allergie. *Münch Med Wschr* 1906; 30: 1457.
31. Janeway CA, Travers P. Allergie und Hypersensibilität. Immunologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2002;505-36.
32. Coombs RRA, Gell PGH. The classification of allergic reactions underlying disease. *Clinical Aspects of Immunology* 1963; 317.
33. Amelung PJ, Postma DS, Xu J, Meyers DA, Bleecker ER. Exclusion of chromosome 11q and the FcepsilonRI-beta gene as aetiological factors in allergy and asthma in a population of Dutch asthmatic families. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 397-403.
34. Platts Mills TA, Wheatley LM, Aalberse RC. Indoor versus outdoor allergens in allergic respiratory disease. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 634-9.
35. Platts Mills TA, Vervloet D, Thomas WR, Aalberse RC, Chapman MD. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 2-24.
36. Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, Stewart AG, Taylor GW, Garrod DR, Cannell MB, Robinson C. Der p1 facilitates transepithelial delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* 1999; 104: 123-33.
37. Vitetta ES, Fernandez Botran R, Myers CD, Sanders VM. Cellular interactions in the humoral immune response. *Adv Immunol* 1989; 45: 1-105.
38. Del Prete G, Maggi E, Parronchi P, Chretien I, Tiri A, Macchia D, Ricci M, Banchereau J, De Vries J, Romagnani S. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J Immunol* 1988; 140: 4193-8.
39. Charlesworth EN. The role of basophils and mast cells in acute and late reactions in the skin. *Allergy* 1997; 52: 31-43.
40. Galli SJ. Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol* 2000; 7: 32-9.

41. Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, Hanau D. Human epidermal langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E. *J Exp Med* 1992; 175: 1285-90.
42. Schwartz LB. Mast cells: function and contents. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 91-7.
43. Wang JM, Rambaldi A, Biondi A, Chen ZG, Sanderson CJ, Mantovani A. Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. *Eur J Immunol* 1989; 19: 701-5.
44. Capron M, Desreumaux P. Immunobiology of eosinophils in allergy and inflammation. *Res Immunol* 1997; 148: 29-33.
45. Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med* 1995; 182: 1169-74.
46. Kay AB, Barata L, Meng Q, Durham SR, Ying S. Eosinophils and eosinophil-associated cytokines in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113: 196-9.
47. Lichtenstein LM. Allergie und Immunsystem. In: *Spektrum der Wissenschaften*, ed. *Das Immunsystem*. Heidelberg: 1993;60-69.
48. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. London: Mosby, 1993.
49. Bentley AM, Kay AB, Durham SR. Human late asthmatic reactions. *Clin Exp Allergy* 1997; 27 Suppl 1: 71-86.
50. Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ, Zeibecoglou K, Khan LN, Barata LT, McEuen AR, Buckley MG, Walls AF, Meng Q, Humbert M, Barnes NC, Robinson DS, Ying S, Kay AB. Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 99-107.
51. Noon L. Prophylactic inoculation of hay fever. *Lancet* 1911; 1: 572-3.
52. Jutel M, Pichler WJ, Skribc D, Urwyler A, Dahinden C, Muller UR. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 1995; 154: 4187-94.
53. Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, Christmann S, Knop J, Saloga J. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and aTh2-to-Th1 shift and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1131-9.
54. Akoum H, Tsicopoulos A, Vorng H, Wallaert B, Dessaint JP, Joseph M, Hamid Q, Tonnel AB. Venom immunotherapy modulates interleukin-4 and interferon-

- gamma messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes. *Immunology* 1996; 97: 593-8.
55. Larche, M. Inhibition of human T cells responses by allergen peptides. *Immunology* 2001; 104: 377-82.
  56. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2045-54.
  57. Hochreiter R, Hartl A, Freund J, Valenta R, Ferreira F, Thalhamer J. The influence of CpG motifs on a protein or DNA-based Th2-type immune response against major pollen allergens Bet v 1a, Phl p 2 and Escherichia coli-derived beta-galactosidase. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124: 406-10.
  58. D'Amato G. Therapy of allergic bronchial asthma with omalizumab- an anti-IgE monoclonal antibody. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3: 371-6.
  59. Steinman RM, Gutchinov B, Witmer MD, Nussenzweig MC. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med* 1983; 157: 613-27.
  60. Mosman TR, Cheriwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-57.
  61. Spiegelberg HL, Raz E. DNA-based approaches to the treatment of allergies. *Curr Opin Mol Ther* 2002; 4: 64-71.
  62. Steitz J, Bruck J, Knop J, Tuting T. Adenovirus-transduced dendritic cells stimulate cellular immunity to melanoma via a CD4(+) T cell-dependent mechanism. *Gene Ther* 2001; 8: 1255-63.
  63. Sudowe S, Montermann E, Steitz J, Tuting T, Knop J, Reske-Kunz AB. Efficacy of recombinant adenovirus as vector for allergen gene therapy in a mouse model of type I allergy. *Gene Ther* 2002; 9: 147-56.
  64. Zhong L, Granelli Piperno A, Choi Y, Steinman RM. Recombinant adenovirus is an efficient and non-perturbing genetic vector for human dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 964-72.
  65. Hardy S, Kitamura M, Harris Stansil T, Dai Y, Phipps ML. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol* 1997; 71: 1842-9.
  66. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 2509-14.

67. Zarei S, Leuba F, Arrighi JF, Hauser C, Piguet V. Transduction of dendritic cells by antigen-encoding lentiviral vectors permits antigen processing and MHC class I-dependent presentation. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 988-94.
68. Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Romani N, Schuler G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996; 26: 659-68.
69. Jonuleit H, Kuhn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandines induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3135-42.
70. Villacres Eriksson M. Antigen presentation by naive macrophages, dendritic cells and B cells to primed T lymphocytes and their cytokine production following exposure to immunostimulating complexes. *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 46-52.
71. Knapp W, Dorken B, Rieber EP. *Leukocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York: Oxford University Press, 1989.
72. Van Voorhis WC, Steinman RM, Hair LS, Luban J, Witmer MD, Koide S, Cohn ZA. Specific antimononuclear phagocyte monoclonal antibodies. Application to the purification of dendritic cells and the tissue localization of macrophages. *J Exp Med* 1983; 158: 126-45.
73. Nadler LM, Anderson KC, Matti G. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen activated and malignant B lymphocytes. *J Immunol* 1983; 131: 244.
74. Lederman S, Yellin MJ, Inghirami J, Lee J, Knowles DM, Chess L. Molecular interactions mediate T-B lymphocyte collaboration in human lymphoid follicles. Roles of T cell-B cell-activating molecule (5c8 antigen) and CD40 in contact-dependent help. *J Immunol* 1992; 149: 3817-26.
75. Valle A, Garrone P, Yssel H, Bonnefoy J-Y, Freedman S, Freeman G, Nadler LM, Banchereau J. mAb 104, a new monoclonal antibody, recognizes the B7 antigen that is expressed on activated B cells and HTLV-1 transformed T cells. *Immunology* 1990; 69: 531-5.
76. Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* 1992; 149: 735-42.
77. Azuma M, Ito D, Yagida H. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 1993; 366: 76.

78. Brickell PM, McConnell I, Milstein C, Wright B. A monoclonal antibody to the HLA-DR product recognizes a polymorphic Ia determinant in mice. *Immunology* 1981; 43: 493-501.
79. Barclay NA, Birkland ML, Brown MH. *The Leukocyte Antigen Facts Book*. Academic Press, 1993;376.
80. Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF, Ziegler A. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* 1978; 14: 9-20.
81. Schwartz LB, Bradford TR, Irani AM, Deblois G, Craig SS. The major enzymes of human mast cell secretory granules. *Am Rev Respir Dis* 1987; 134: 1186-9.
82. Raz E, Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Roman M, Swain SL, Spiegelberg HL, Carson DA. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 5141-5.
83. Horner AA, Van Uden JH, Zubeldia JM, Broide D, Raz E. DNA-based immunotherapeutics for the treatment of allergic disease. *Immunol Rev* 2001; 179: 102-18.
84. Kline JN. Effects of CpG DNA on Th1/Th2 balance in asthma. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 247: 211-25.
85. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 9305-10.
86. Horner AA, Nguyen MD, Ronaghy A, Cinman N, Verbeek S, Raz E. DNA-based vaccination reduces the risk of lethal anaphylactic hypersensitivity in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 349-56.
87. Nestle FO. Dendritic cell vaccination for the treatment of skin cancer. *Recent Results Cancer Res* 2002; 160: 165-9.
88. Nestle FO. Dendritic cell vaccination for cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19: 6673-9.
89. Jenne L, Schuler G, Steinkasserer A. Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy. *Trends in Immunology* 2001; 22: 102-7.
90. Arthur JF, Butterfield LH, Roth MD, Bui LA, Kiertscher SM, Lau R, Dubinett S, Glaspy J, McBride WH, Economou JS. A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther* 1997; 4: 17-25.

91. Jonuleit H, Tuting T, Steitz J, Bruck J, Giesecke A, Steinbrink K, Knop J, Enk AH. Efficient transduction of mature CD83+ dendritic cells using recombinant adenovirus suppressed T cell stimulatory capacity. *Gene Ther* 2000; 7: 249-54.
92. Christ M. Gene therapy with recombinant adenovirus vectors: evaluation of the host immune response. *Immunol Letters* 2003; 57: 19-25.
93. Brossart P, Goldrath AW, Butz EA, Martin S, Bevan MJ. Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL. *J Immunol* 1997; 158: 3270-6.
94. Quantum Biotechnologies. Ad-Easy Vector System. 2000. Ref Type: Catalog
95. Thalhamer J, Leitner W, Hammerl P, Brtko J. Designing immune responses with genetic immunization and immunostimulatory DNA sequences. *Endocr Regul* 2001; 35: 143-66.
96. Blanas E, Davey GM, Carbone FR, Heath WR. A bone marrow-derived APC in the gut-associated lymphoid tissue captures exogenous oral antigens and presents them to both CD4<sup>+</sup>- and CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2000; 164: 2890-6.
97. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89: 587-96.
98. Ouyang W, Lohning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A, Murphy KM. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 2000; 12: 27-37.
99. Hamelmann E, Oshiba A, Paluh J, Bradley K, Loader J, Potter TA, Larsen GL, Gelfand EW. Requirement for CD8+ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *J Exp Med* 1996; 183: 1719-29.
100. Moore KW, O'Garra A, De Waal Malefyt R, Vieira P, Mosman TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 165-90.
101. Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cells clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *Journal of Immunology* 1993; 150: 353-60.
102. De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C. Interleukin-10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991; 174: 915-24.



103. Willems F, Marchant A, Delville JP, Gerard C, Delvaux A, Velu T. Interleukin-10 inhibits B7 and intracellular adhesion molecule-I expression on human monocytes. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1007-9.
104. De Waal Malefyt R, Abrams JS, Bennett B, Figdor C. Interleukin-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174: 1209-20.
105. Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. Endogenous IL-10 suppress allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 775-83.
106. Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 2002; 39: 531-6.
107. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997; 185: 461-9.
108. Smits HH, Hilkens C, Kalinski P, Kapsenberg ML, Wierenga EA. How to deal with polarized Th2 cells: exploring the achilles' heel. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126: 102-10.
109. Chung F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma. *Mediators Inflamm* 2003; 10: 51-9.
110. Hilkens C, Kalinski P, de Boer M, Kapsenberg ML. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* 1997; 90: 1920-6.
111. Magram J, Sfarra J, Connaughton S, Faherty D, Warriar R, Carvajal D, Wu CY, Stewart C, Sarmiento U, Gately MK. IL-12-deficient mice are defective but not devoid of type 1 cytokine responses. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 795: 60-70.
112. Monteiro J, Trinchieri G. Does interleukin-12 play a role in the viral immune response? *Ann N Y Acad Sci* 1996; 795: 366-7.
113. Orange JS, Biron CA. An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J Immunol* 1996; 156: 1138-42.
114. Stampfli MR, Ritz SA, Neigh GS, Sime PJ, Lei XF, Xing Z, Croitoru K, Jordana M. Adenoviral infection inhibits allergic airways inflammation in mice. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 1581-90.

## VI. Zusammenfassung

Immunreaktionen gegen Antigene können eine zelluläre Immunantwort, eingeleitet durch  $T_H1$ -Zellen induzieren oder aber eine antikörpervermittelte humorale Immunantwort induzieren, die von Zellen des  $T_H2$ -Typs bestimmt sind. Diese unterschiedlichen Immunreaktionen regulieren sich gegenseitig, indem sie sich wechselseitig unterdrücken. Dadurch stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Immunantworten ein. Die Allergie vom Soforttyp ist  $T_H2$ -dominiert und wird ausgelöst durch die Produktion spezifischer IgE-Antikörper gegen eigentlich harmlose Antigene. Durch die frühe Ausschüttung des Zytokins IL-4 von T-Zellen differenzieren naive allergenspezifische T-Zellen zu  $T_H2$ -Zellen aus. Diese sezernieren dann ebenfalls IL-4 und auch IL-13, was die B-Zellen zu einer vermehrten Produktion von IgE-Molekülen stimuliert. IgE bindet an den hochaffinen IgE-Rezeptor auf Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen. Bei weiterem Allergenkontakt kommt es durch Kreuzvernetzung der  $Fc\epsilon$ -Rezeptoren zur Ausschüttung von Mediatoren, welche die typischen Symptome einer allergischen Reaktion auslösen. Als Therapie wird zurzeit die spezifische Immuntherapie angewandt, bei der der Patient das entsprechende Allergen in immer höher werdenden Dosen injiziert bekommt. Dadurch wird die T-Zellantwort umgewandelt, resultierend in einer vermehrten Produktion von IgG- statt IgE-Antikörpern. Es wird angenommen, dass so eine Desensibilisierung des Allergikers induziert wird.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Frage behandelt, ob es durch den Einsatz von dendritischen Zellen, die mit der DNA eines Allergens transfiziert wurden, zu einer Verschiebung der  $T_H2$ - in Richtung einer  $T_H1$ -Immunantwort kommt. Zu diesem Zweck wurden humane Monozyten aus dem peripherem Blut von Allergikern isoliert und mit IL-4 und GM-CSF kultiviert. Mit der Gabe eines Zytokincocktails, der die Zellen zur Ausreifung bringt, wurden sie mit einem Adenovirus, der die DNA des Allergens des Lieschgraspollens Phl p 1 enthält, transfiziert.

Nachdem die Zellen vollständig ausgereift waren, wurde zuerst die Transfektionseffizienz überprüft. Zu diesem Zweck wurden die dendritischen Zellen mit

einem Adenovirus, der für das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) kodiert, transfiziert und die Zahl der transfizierten Zellen im Durchflußcytometer untersucht. Bei einer Viruskonzentration von MOI 300 ergab sich eine Rate von 92% transfizierten reifen dendritischen Zellen. Zur Kontrolle, ob die adenovirale Transfektion die Ausreifung der dendritischen Zellen beeinflusst, wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker, die spezifische für reife dendritische Zellen sind, untersucht. Die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, MHC-I und HLA-DR sowie der DC-spezifische Marker CD83 wurden auf transfizierten wie auch auf Protein-gepulsten dendritischen Zellen in gleichem Masse exprimiert. Die Zugabe des Virus zu unreifen dendritischen Zellen induzierte keine Ausreifung dieser. Die Transfektion mittels Adenovirus verändert die dendritische Zellen nicht in ihren Eigenschaften, Antigene zu präsentieren. Ob die dendritischen Zellen das transfizierte Allergen auch als Protein exprimieren, wurde mit Hilfe eines Western-Blots überprüft. Dabei konnte eine spezifische Bande der Größe 35 kDa nachgewiesen werden. Diese Bande war nur bei den Zellen zu finden, die mit dem Virus transfiziert wurden, gefunden. Bei nicht-transfizierten dendritischen Zellen konnte keine Bande nachgewiesen werden. Die transfizierten dendritischen Zellen exprimieren also das Allergen.

Nachdem geklärt war, dass die Zellen sich sehr effizient mit Allergen-DNA transfizieren lassen, ihre Ausreifung und Viabilität dadurch nicht beeinträchtigt wird und sie das korrespondierende Allergen exprimieren, wurden sie mit entweder CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kokultiviert und anschließend die Proliferation sowie die Zytokinproduktion der T-Zellen gemessen. Die mit Allergen-DNA transfizierten dendritischen Zellen induzierten sowohl bei CD4<sup>+</sup>- als auch bei CD8<sup>+</sup>-T-Zellen eine starke Proliferation. Wurde die Viruskonzentration verringert, nahm auch die Proliferation der T-Zellen ab. Protein-gepulste dendritische Zellen, die als Postivkontrolle eingesetzt wurden, induzierten eine ähnliche starke Proliferation der T-Zellen. Wurden dendritische Zellen mit einem Adenovirus transfiziert, der keine Allergen-DNA-Sequenzen enthielt, so konnten die T-Zellen nicht zu einer Proliferation angeregt werden.

Als Zytokine wurden die typischen T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4 und IL-5 gemessen, das regulatorische Zytokin IL-10, das sowohl von T<sub>H</sub>1- als auch von T<sub>H</sub>2-Zellen gebildet wird und das T<sub>H</sub>1-Zytokin IFN- $\gamma$  gemessen. Nach Stimulation mit Allergen-DNA-

transfizierten dendritischen Zellen sezernierten  $CD4^+$ -T-Zellen weniger IL-4 und IL-5, aber signifikant größere Mengen des  $T_H1$ -Zytokins IFN- $\gamma$ , verglichen mit der durch Protein-gepulsten dendritischen Zellen induzierten Zytokinproduktion. Auch die  $CD8^+$ -T-Zellen produzierten signifikant mehr IFN- $\gamma$ , wenn sie durch Allergen-DNA-transfizierten dendritischen Zellen stimuliert wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass durch den Einsatz von dendritischen Zellen, die mit Allergen-DNA transfiziert wurden, eine verstärkte  $T_H1$ - und eine verminderte  $T_H2$ -Immunantwort sowohl bei  $CD4^+$ - als auch bei  $CD8^+$ -T-Zellen induziert werden kann. Es ist vorstellbar, dass solch ein Konzept eine Alternative zur spezifischen Immuntherapie werden kann.