

# **Inhibition allergenspezifischer Immunantworten im Mausmodell der Typ-I Allergie nach biolistischer Vakzinierung mit allergenkodierenden Plasmiden in Kombination mit für immunmodulatorische Moleküle kodierender Plasmid-DNA**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Yvonne Höhn

geb. am 30.03.1982 in Mainz

Aachen, 20.12.2011

Dekan:

1. Berichterstatterin:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2012

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Aachen, den 20.12.2011

---

Yvonne Höhn

## **A) Inhaltsverzeichnis**

|           |                                                                                         |             |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>A)</b> | <b>Inhaltsverzeichnis</b>                                                               | <b>I</b>    |
| <b>B)</b> | <b>Danksagungen</b>                                                                     | <b>VIII</b> |
| <b>C)</b> | <b>Veröffentlichungen</b>                                                               | <b>IX</b>   |
| <br>      |                                                                                         |             |
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b>                                                                       | <b>1</b>    |
| 1.1       | Allergien/allergisches Asthma                                                           | 1           |
| 1.2       | Immuntherapie mit Hilfe der biolistischen DNA-Immunisierung                             | 5           |
| 1.3       | Dendritische Zellen                                                                     | 9           |
| 1.4       | Th1- und Th2-Zellen                                                                     | 12          |
| 1.5       | Regulatorische T-Zellen und die immunregulatorischen Zytokine<br>IL-10 und TGF- $\beta$ | 14          |
| 1.6       | Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)                                                         | 16          |
| 1.7       | Ziele der Arbeit                                                                        | 20          |
| <br>      |                                                                                         |             |
| <b>2.</b> | <b>Material und Methoden</b>                                                            | <b>21</b>   |
| 2.1       | Material                                                                                | 21          |
| 2.1.1     | Geräte                                                                                  | 21          |
| 2.1.2     | Materialien                                                                             | 24          |
| 2.1.3     | Chemikalien                                                                             | 27          |
| 2.1.4     | Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien                                                   | 31          |
| 2.1.4.1   | Puffer und Lösungen                                                                     | 31          |
| 2.1.4.2   | Lösungen für die Anästhesie                                                             | 33          |
| 2.1.4.3   | Lösungen für die FACS-Analyse                                                           | 34          |
| 2.1.4.4   | Puffer und Lösungen für ELISA                                                           | 35          |
| 2.1.4.5   | Lösungen für die Herstellung von Gen-Pistolen-Patronen                                  | 35          |
| 2.1.4.6   | Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze                                                  | 36          |
| 2.1.4.7   | Nährmedien und Nährböden für die Bakterienkultur                                        | 38          |
| 2.1.5     | Längenstandards                                                                         | 38          |

|           |                                                                   |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.6     | Bakterienstamm                                                    | 38 |
| 2.1.7     | Enzyme                                                            | 39 |
| 2.1.8     | Fertigsysteme                                                     | 39 |
| 2.1.9     | Primer                                                            | 40 |
| 2.1.9.1   | Primer für die Realtime-PCR                                       | 40 |
| 2.1.10    | Plasmide                                                          | 40 |
| 2.1.11    | Antikörper                                                        | 40 |
| 2.1.11.1  | Antikörper für die Absättigung der FC $\gamma$ RII/III-Rezeptoren | 40 |
| 2.1.11.2  | Antikörper für die FACS-Analyse                                   | 41 |
| 2.1.11.3  | Isotypenkontrollantikörper                                        | 41 |
| 2.1.11.4  | Antikörper für Immunglobulin-ELISA                                | 42 |
| 2.1.11.5  | Antikörper für Zytokin-ELISA/IFN- $\gamma$ -EliSpot               | 42 |
| 2.1.12    | MACS <sup>®</sup> MicroBeads                                      | 44 |
| 2.1.13    | Peptide                                                           | 44 |
| 2.1.14    | Antigene                                                          | 44 |
| 2.1.15    | Zytokine                                                          | 44 |
| 2.1.16    | Zelllinien                                                        | 45 |
| 2.1.17    | Mäuse                                                             | 45 |
| 2.2       | Tierversuche                                                      | 45 |
| 2.2.1     | Immunisierungsmethoden                                            | 45 |
| 2.2.1.1   | DNA-Immunisierung mit der Genpistole                              | 45 |
| 2.2.1.1.1 | Kopplung von Plasmid-DNA an Goldpartikel                          | 45 |
| 2.2.1.1.2 | Herstellung von Patronen für die Genpistole                       | 46 |
| 2.2.1.1.3 | Durchführung der biolistischen Transfektion                       | 47 |
| 2.2.1.2   | Proteinimmunisierungsmethoden                                     | 47 |
| 2.2.1.2.1 | subkutane (s.c.) Immunisierung                                    | 47 |
| 2.2.1.2.2 | intranasale (i.n.) Immunisierung                                  | 47 |
| 2.2.2     | Nicht-invasive Messung der Atemwegsreaktivität                    | 48 |
| 2.3       | Zellbiologische Methoden                                          | 49 |
| 2.3.1     | Kultivierung von Zellen                                           | 49 |
| 2.3.2     | Einfrieren von Zellen                                             | 49 |
| 2.3.3     | Auftauen von Zellen                                               | 50 |
| 2.3.4     | Bestimmung der Zellzahl                                           | 50 |
| 2.3.5     | Präparation von Milzzellen                                        | 51 |

|          |                                                                                                                                                       |    |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.6    | Präparation von Lungenzellen                                                                                                                          | 51 |
| 2.3.7    | Präparation von Lymphknotenzellen                                                                                                                     | 52 |
| 2.3.8    | Antigenspezifische Stimulation von Immunzellen zur Zytokinproduktion                                                                                  | 52 |
| 2.3.9    | CTL-EliSpot                                                                                                                                           | 53 |
| 2.3.10   | Bronchoalveoläre Lavage (BAL)                                                                                                                         | 54 |
| 2.3.11   | Herstellung von Zytospinpräparaten                                                                                                                    | 55 |
| 2.3.12   | Differenzierung der Zellen aus der BAL                                                                                                                | 55 |
| 2.3.13   | ELISA zur Bestimmung der Zytokinproduktion in Zellkulturüberständen<br>und in den Überständen der BAL                                                 | 57 |
| 2.3.14   | Serumgewinnung                                                                                                                                        | 58 |
| 2.3.15   | ELISA zur Bestimmung antigenspezifischer Immunglobuline (Ig)                                                                                          | 58 |
| 2.3.16   | Transiente Transfektion von Zellen mit Fugene HD                                                                                                      | 60 |
| 2.3.17   | Nachweis von Tryptophan und Kynureninen mittels HPLC                                                                                                  | 60 |
| 2.3.18   | Magnetische Zellseparation mit Hilfe der MACS <sup>®</sup> -Technologie - Positive<br>Anreicherung von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen | 61 |
| 2.3.19   | Durchflusszytometrie                                                                                                                                  | 62 |
| 2.3.19.1 | Oberflächenfärbung zur Kontrolle der Reinheit von Zellen nach der<br>MACS-Separation                                                                  | 63 |
| 2.3.19.2 | Oberflächenfärbung und intrazelluläre FoxP3-Färbung                                                                                                   | 64 |
| 2.4      | Molekularbiologische Methoden                                                                                                                         | 65 |
| 2.4.1    | Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von<br>Nukleinsäuren                                                                           | 65 |
| 2.4.2    | Agarosegelelektrophorese                                                                                                                              | 65 |
| 2.4.3    | Polymerasekettenreaktion (PCR)                                                                                                                        | 66 |
| 2.4.4    | Quantitative („Realtime“)-PCR                                                                                                                         | 68 |
| 2.4.5    | Analytische Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA                                                                                                      | 69 |
| 2.4.6    | Transformation elektrokompetenter Bakterien                                                                                                           | 70 |
| 2.4.7    | Aufreinigung von Plasmid-DNA                                                                                                                          | 70 |
| 2.4.7.1  | Plasmid-Mini-/Midi-/Maxipräparation                                                                                                                   | 70 |
| 2.4.7.2  | Isopropanol-Minipräparation                                                                                                                           | 71 |
| 2.4.7.3  | Endotoxinfreie Aufreinigung von Plasmid DNA                                                                                                           | 71 |
| 2.4.8    | Fällung von DNA                                                                                                                                       | 72 |
| 2.4.9    | RNA-Isolierung                                                                                                                                        | 72 |
| 2.4.10   | Reverse Transkription                                                                                                                                 | 73 |

|           |                                                                                                                                                                                                                 |           |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b>                                                                                                                                                                                               | <b>74</b> |
| 3.1       | Untersuchungen des Einflusses einer biolistischen DNA-<br>Immunisierung mit pFascin-βGal zusammen mit IL-10- und<br>TGF-β-kodierender Plasmid-DNA auf die Entstehung einer<br>allergenspezifischen Immunantwort | 75        |
| 3.1.1     | Effekt einer biolistischen Koimmunisierung von pFascin-βGal mit<br>pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF-β auf die transgenspezifische humorale<br>Immunantwort                                                              | 76        |
| 3.1.2     | Effekt einer biolistischen Koimmunisierung von pFascin-βGal mit<br>pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF-β auf die antigenspezifische<br>Zytokinproduktion                                                                   | 77        |
| 3.1.3     | Effekt einer biolistischen Koimmunisierung von pFascin-βGal mit<br>pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF-β auf die Induktion transgenspezifischer<br>IFN-γ-produzierender CD8 <sup>+</sup> Effektor-T-Zellen                 | 80        |
| 3.1.4     | Effekt einer biolistischen Koimmunisierung von pFascin-βGal mit<br>pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF-β auf die Entstehung einer<br>Atemwegshyperreaktivität.                                                             | 80        |
| 3.1.5     | Effekt einer biolistischen Koimmunisierung von pFascin-βGal mit<br>pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF-β auf die zelluläre Zusammensetzung in<br>der bronchoalveolären Flüssigkeit                                         | 84        |
| 3.2       | Untersuchungen des Einflusses einer biolistischen<br>Koimmunisierung mit pFascin-βGal und IL-10- bzw. TGF-β-<br>kodierender Plasmid-DNA im Mausmodell der antigeninduzierten<br>Atemwegsentszündung             | 87        |
| 3.2.1     | Effekt einer prophylaktischen Immunisierung mit pFascin-βGal und<br>pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF-β auf die IgG-Produktion                                                                                           | 88        |
| 3.2.2     | Effekt einer prophylaktischen Immunisierung mit pFascin-βGal und<br>pCMV-IL10 bzw. pCMV-TGFβ auf die Zytokinproduktion                                                                                          | 91        |
| 3.2.3     | Effekt einer prophylaktischen Immunisierung mit pFascin-βGal und<br>pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF-β auf die im Mausmodell der<br>antigeninduzierten Atemwegsentszündung hervorgerufene                               |           |

|       |                                                                                                                                                                                             |     |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|       | Atemwegshyperreaktivität                                                                                                                                                                    | 92  |
| 3.2.4 | Effekt einer prophylaktischen Immunisierung mit pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$ auf die im Mausmodell der antigeninduzierten Atemwegsentszündung hervorgerufene Eosinophilie in der Lunge | 94  |
| 3.2.4 | Effekt einer prophylaktischen Immunisierung mit pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$ auf die die Induktion IFN- $\gamma$ -produzierender CD8 <sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen               | 99  |
| 3.3   | Untersuchungen zum Einfluss einer biolistischen DNA-Immunisierung mit $\beta$ Gal- und IDO-kodierender Plasmid-DNA auf die Entstehung einer antigenspezifischen Immunantwort                | 100 |
| 3.3.1 | <i>In vitro</i> -Analysen zum Nachweis der Funktionalität IDO-kodierender Plasmid-DNA                                                                                                       | 102 |
| 3.3.2 | Effekt einer biolistischen Koimmunisierung mit $\beta$ Gal- und IDO-kodierenden Plasmid-Vektoren auf die transgenspezifische humorale Immunantwort                                          | 106 |
| 3.3.3 | Effekt einer biolistischen Koimmunisierung mit $\beta$ Gal- und IDO-kodierenden Plasmid-Vektoren auf die transgenspezifische Zytokinproduktion                                              | 107 |
| 3.3.4 | Effekt einer biolistischen Koimmunisierung mit IDO-kodierenden Plasmiden auf die Induktion transgenspezifischer IFN- $\gamma$ -produzierender CD8 <sup>+</sup> Effektor-T-Zellen            | 112 |
| 3.3.5 | Effekt einer biolistischen Koimmunisierung mit IDO-kodierenden Plasmiden auf die Entstehung einer Atemwegshyperreaktivität                                                                  | 114 |
| 3.3.6 | Effekt einer biolistischen Koimmunisierung mit IDO-kodierenden Vektoren auf die zelluläre Zusammensetzung der bronchoalveolären Flüssigkeit                                                 | 116 |
| 3.3.7 | Untersuchung zur Induktion regulatorischer T-Zellen nach biolistischen Koimmunisierung mit IDO-kodierenden Plasmiden                                                                        | 120 |
| 3.4   | Prophylaktische Vakzinierung mit IDO-kodierender Plasmid-DNA im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentszündung                                                                      | 124 |
| 3.4.1 | Effekt einer prophylaktischen Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal- und IDO-kodierenden Vektoren auf die durch eine Proteinsensibilisierung induzierte IgG-Produktion                      | 125 |
| 3.4.2 | Effekt einer prophylaktischen Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal- und IDO-kodierenden Vektoren auf die antigenspezifische Zytokinproduktion                                              | 127 |
| 3.4.3 | Effekt einer prophylaktischen Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal- und IDO-                                                                                                               |     |



|       |                                                                                                                                                                               |     |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|       | kodierenden Vektoren auf die Atemwegsreaktivität                                                                                                                              | 130 |
| 3.4.4 | Effekt einer prophylaktischen Vakzinierung mit pFascin-βGal- und IDO-kodierenden Vektoren auf die Zusammensetzung der Zellen in der bronchoalveolären Flüssigkeit             | 132 |
| 3.4.5 | Effekt einer prophylaktischen Vakzinierung mit pFascin-βGal- und IDO-kodierenden Vektoren auf die Frequenz IFN-γ-produzierender CD8 <sup>+</sup> Effektor-T-Zellen            | 135 |
| 3.5   | Therapeutische Kovakzinierung mit IDO-kodierender Plasmid-DNA im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung                                                        | 137 |
| 3.5.1 | Einfluss einer therapeutischen Vakzinierung mit βGal-kodierenden Vektoren zusammen mit pCMV-IDO auf die IgG-Produktion                                                        | 138 |
| 3.5.2 | Einfluss einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit βGal-kodierenden Vektoren zusammen mit pCMV-IDO auf die Atemwegsreaktivität                                              | 141 |
| 3.5.3 | Einfluss einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit βGal-kodierenden Vektoren zusammen mit pCMV-IDO auf die zelluläre Zusammensetzung der bronchoalveolären Flüssigkeit      | 142 |
| 3.5.5 | Einfluss einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit βGal-kodierenden Vektoren zusammen mit pCMV-IDO auf die Frequenz IFN-γ-produzierender CD8 <sup>+</sup> Effektor-T-Zellen | 148 |

## **4. Diskussion** **152**

|     |                                                                                                                                                                                                  |     |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1 | Durch eine biolistische Koimmunisierung mit Kombinations-Vakzinen, bestehend aus pFascin-βGal und einem immunregulatorischen Molekül, können allergenspezifische Immunantworten inhibiert werden | 152 |
| 4.2 | Nach einer biolistischen DNA-Immunisierung können keine regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden                                                                                             | 166 |
| 4.3 | Eine protektive antigenspezifische DNA-Immunisierung in Verbindung mit pCMV-IL-10 hat einen inhibitorischen Effekt auf die Entwicklung einer Atemwegsreaktivität                                 | 166 |
| 4.4 | Eine Immunisierung mit pFascin-βGal hat einen inhibitorischen                                                                                                                                    |     |

|           |                                                                                                                                                                                                                                           |              |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
|           | Effekt auf die Atemwegshyperreaktivität in einem therapeutischen Modell der Typ-I Allergie, der durch Koimmunisierung mit pCMV-IDO noch weiter gesteigert werden kann                                                                     | 171          |
| 4.5       | Eine Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal hat einen inhibitorischen Effekt auf die Atemwegshyperreaktivität in einem therapeutischen Modell der Typ-I Allergie, der durch Koimmunisierung mit pCMV-IDO nicht weiter gesteigert werden kann | 174          |
| <b>5.</b> | <b>Zusammenfassung</b>                                                                                                                                                                                                                    | <b>177</b>   |
| <b>6.</b> | <b>Abstract</b>                                                                                                                                                                                                                           | <b>179</b>   |
| <b>D)</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>                                                                                                                                                                                                               | <b>X</b>     |
| <b>E)</b> | <b>Abkürzungsverzeichnis</b>                                                                                                                                                                                                              | <b>XVIII</b> |
| <b>F)</b> | <b>Lebenslauf</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>XXIV</b>  |

**B) Danksagungen**

## **C) Veröffentlichungen**

### **Originalpublikationen**

J. Meiler, E. Vaniet, M. Guyot, S. Hoffarth, Y. Höhn, Ch. Huber, and M. Schuler: *Sensitizing drug-resistant non-small cell lung cancers to the protein kinase C-specific PKC412 by therapeutic targeting of BAK*. **Onkologie 28 (Suppl. 3): 121 (2005).**

S. Thaler, P. Hähnel S. Hoffarth, Y. Höhn, and M. Schuler: *Restoration of RASSF1A expression results in growth arrest of drug-resistant non-small cell lung cancer in vitro and in vivo*. **Onkologie 28 (Suppl. 3): 128 (2005).**

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

Hausding M-, Tepe M., Ubel C., Lehr HA, Röhring B., Höhn Y., Pautz A., Eigenbrod T., Anke T. Kleinert H., Erkel G., Finotto S.. *Induction of tolerogenic lung CD4+ T cells by local treatment with a STAT-3 and pSTAT-5 inhibitor ameliorated experimental allergic asthma*. **International Immunology 2011 Jan; 23(1): 1-15.**

### **Kongressbeiträge**

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

Y. Höhn, A. Renzing, E. Montermann, A. Habermeier, P. Scholtes, S. finotto, E. Closs, M. Bros, S. Grabbe, A. B. Reske-Kunz and S. Sudowe. *Concurrent production of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) after biolistic DNA vaccination inhibits initiation of transgene-specific immune responses*. **2<sup>nd</sup> European Congress of Immunology, 13.-16. September 2009, Berlin.**

V. Raker, C. Barwig, Y. Höhn, E. Montermann, S. Grabbe, A. B. Reske-Kunz, S. Sudowe. *DNA-based co-expression of TGF- $\beta$ 1 limits transgene-specific immune responses in a mouse model of type I allergy*.

**22. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 11. - 12. März 2010, Mainz.**

Y. Höhn, A. Renzing, E. Montermann, P. Scholtes, E. Closs, A. B. Reske-Kunz and S. Sudowe. *Co-expression of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) after gene gun-mediated DNA vaccination suppresses induction of transgene-specific immune responses*.

**XXVII. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), 07. - 11. Juni 2008, Barcelona, Spanien.**

S. Sudowe, Y. Höhn, A. Renzing, J. Maxeiner, E. Montermann, C. Taube, S. Grabbe, A. B. Reske-Kunz. *Effect of co-expression of indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) following gene gun-mediated DNA immunization on transgene-specific immune responses.*

40th Annual Meeting DGfI German Society for Immunology, 22. – 25. September, Leipzig

Y. Höhn, A. Renzing, E. Montermann, J. Maxeiner, A. Habermeier, E. Closs, C. Taube A. B. Reske-Kunz and S. Sudowe. *DNA-based co-expression of indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibits transgene-specific immune responses after gene gun mediated DNA vaccination.*

11th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology – DC2010: Forum on Vaccine Science, 26. – 10. September, Lugano, Switzerland.

V. Raker, Y. Höhn, E. Montermann, J. Maxeiner, C. Taube, S. Grabbe, A. B. Reske-Kunz, S. Sudowe. *Impact of biolistic co-vaccination with TGF- $\beta$ 1 encoding plasmid DNA on antigen-specific immune responses in a mouse model of type I allergy.*

11th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology – DC2010: Forum on Vaccine Science, 26. – 10. September, Lugano, Switzerland.

# **1. Einleitung**

Das Immunsystem besitzt die Aufgabe zwischen körpereigenen und körperfremden sowie zwischen harmlosen und schädlichen Antigenen zu unterscheiden. Ein Verlust der Toleranz gegenüber harmlosen oder körpereigenen Antigenen kann zu allergischen Erkrankungen bzw. Autoimmunität führen [Buckner *et al.*, 2004].

Die Entwicklung allergischer Erkrankungen wie z.B. Nahrungsmittelallergien, allergischen Atemwegserkrankungen und der atopischen Dermatitis hat im Laufe der letzten Jahrzehnte, auch aufgrund einer Veränderung der Umweltbedingungen, in den westlichen Ländern stark zugenommen. Es ist daher wichtig neue wirksame Therapieformen gegen diese Überempfindlichkeitsreaktionen des Immunsystems zu entwickeln.

## **1.1 Allergien/allergisches Asthma**

Bei der Entstehung von Allergien spielen unter anderem die genetische Disposition, die Art des Antigens sowie Umwelteinflüsse eine wichtige Rolle [Johnson *et al.*, 2002, Akkoc *et al.*, 2011]. Die Symptome von Asthma können unter anderem verstärkt werden durch starke Emotionen oder Stress, virale Infektionen oder die Luftverschmutzung [Johnson *et al.*, 2002]. Bei Allergenen handelt es sich meist um lösliche Proteine, die oft eine enzymatische Aktivität aufweisen. Darauf und auf den aerodynamischen Eigenschaften und der Partikelgröße beruhen möglicherweise ihre allergenen Eigenschaften [Kay, 2000]. Die Hauptallergene in westlichen industrialisierten Ländern sind Der p1 und Der p2 aus dem Kot der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides*, Fel d 1 aus dem Speichel von Katzen, verschiedene von Pflanzen abstammende Pollenallergene wie Bet v 1 von der Birke oder Phl p 1 und Phl p 2 vom Wiesen-Lieschgras [Kay, 2000].

Das vermehrte Vorkommen von Allergien in westlichen Ländern wird unter anderem durch die Hygienehypothese erklärt. In der 1989 von David P. Strachan formulierten Hygienehypothese postuliert dieser, dass aufgrund des durch Impfungen und der Verwendung von Antibiotika bedingten Rückgangs von Infektionskrankheiten viele durch Th1-Zellen vermittelte Immunreaktionen nicht mehr stattfinden. Dies führt zu einer Disbalance des Immunsystems und in Folge dessen zu einem verstärkten Vorkommen von durch Th2-Zellen vermittelten Reaktionen auf harmlose Umweltantigene sowie damit einhergehend zu einem

vermehrten Vorkommen von Allergien [Hayashi *et al.*, 2004]. Die Hygienehypothese wurde im Laufe der Zeit modifiziert und erweitert. Yazdanbakhsh *et al.* beschrieben 2001, dass in Bevölkerungen mit häufig auftretenden Wurmerkrankungen weniger Allergien vorkommen als bei Bevölkerungsgruppen, bei denen keine Infektionen dieser Art vorkommen [Yazdanbakhsh *et al.*, 2001]. Eine Helminthen-Infektion induziert zunächst eine starke Th2-Antwort, die mit einer Eosinophilie und einer erhöhten IgE-Produktion einhergeht, inhibiert aber durch Th2-Zellen vermittelte Inflamationsreaktionen wie z.B. Allergien. Da während der Infektion große Mengen der Zytokine Interleukin (IL-)10 und Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) gebildet werden, scheint es naheliegend zu sein, dass sogenannte regulatorische T Zellen (Treg) während der Infektion gebildet werden, die eine Rolle bei der Inhibition sowohl von Th1- als auch von Th2-Antworten spielen [Maizels und Yazdanbakhsh, 2003].

Allergien werden anhand verschiedener Charakteristika wie dem Krankheitsbild, dem zeitlichen Ablauf, den beteiligten Komponenten des Immunsystems, der Art des Antigens und dem Wirkmechanismus in vier Gruppen eingeteilt [Coombs und Gell 1968].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit Allergien des Soforttyps (Typ-I Hypersensitivität), zu denen auch das allergische Asthma gehört [Kay, 2000]. Der Verlust der Toleranz gegenüber Allergenen wie z.B. Aeroallergenen, Nahrungsmittelallergenen oder Insektengift führt zu dieser Typ-I Hypersensitivität [Akkoc *et al.*, 2011]. In industrialisierten Nationen spielen die Typ-I Allergien eine zunehmende Rolle als Volkserkrankung. Etwa 20 Prozent der Bevölkerung leiden unter solchen Überempfindlichkeitsreaktionen [Cookson und Moffatt, 1997]. Eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von allergischen Typ-I Reaktionen, spielt die Erkennung von harmlosen Fremdproteinen durch das Immunsystem. Die Neigung zu solchen Überempfindlichkeitsreaktionen ist genetisch bedingt und gekennzeichnet durch einen positiven Pricktest und erhöhte IgE-Mengen im Serum und wird als Atopie bezeichnet [Kay, 2000]. Bei Atopikern kommt es während einer allergischen Immunantwort zu einer starken Proliferation von Th2-Zellen, die IL-4, IL-5 und IL-13 sekretieren. Diese von Th2-Zellen sezernierten Zytokine fördern die Bildung allergenspezifischer IgE-Antikörper und induzieren eine durch eine Eosinophile gekennzeichnete Gewebeinflammation. In nicht-atopischen Individuen führt eine Immunantwort auf Allergene hingegen zu einer antigenspezifischen Produktion von IgG-Antikörpern und zu einer Th1-polarisierten Immunantwort einhergehend mit einer erhöhten IFN- $\gamma$ -Produktion [Johnson *et al.*, 2002, Kay, 2000].

Allergische Erkrankungen können immunologisch in zwei Phasen unterteilt werden. Während der ersten Sensibilisierung mit dem Allergen, kommt es zur klonalen Expansion von allergenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen und zu einer erhöhten IgE-Produktion durch B-Zellen. Während dieser Phase werden zusätzlich auch T- und B-Gedächtniszellen gebildet [Akdis und Akdis 2011, Palomares *et al.*, 2010]. Die vermehrte Bildung des allergenspezifischen IgE führt zu einer allergischen Sensibilisierung [Lewis, 2002, Morjaria *et al.*, 2007].

Das IgE bindet an hochaffine FcεRI-Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen, Basophilen und anderen Zellen [Geha *et al.*, 2003]. Die Expression dieser Rezeptoren ist bei atopischen Individuen gesteigert [Maurer *et al.*, 1994].

In der Provokationsphase, werden bei erneutem Kontakt mit dem Allergen die FcεRI-Rezeptoren über die gebundenen IgE-Moleküle kreuzvernetzt, wodurch die Mastzellen oder Basophilen aktiviert werden und degranulieren. Als Folge werden Mediatoren wie Histamine und Leukotriene sowie Chemokine und Zytokine freigesetzt [Kay, 2000, Busse und Neaville, 2001]. Dies hat die typischen Symptome einer allergischen Entzündung wie Juckreiz, Niesen, eine Erweiterung der Blutgefäße, eine gesteigerte Gefäßpermeabilität, eine erhöhte Schleimproduktion und eine Verengung der glatten Muskulatur zur Folge [Durham, 1999, Johnson *et al.*, 2002]. Des Weiteren kommt es zu einer weiteren Aktivierung von Th2-Zellen und zu einer Entzündung des Gewebes [Morjaria *et al.*, 2007, Akdis und Akdis, 2011, Palomares *et al.*, 2010].

Eine wichtige Behandlungsart von allergischen Erkrankungen ist die Ende des 19. Jahrhunderts am St Mary's Hospital in London von Freeman und Noon entwickelte spezifische Immuntherapie (SIT). Bei dieser auch Hyposensibilisierung genannten Therapieform wird dem Patienten das Allergen, das normalerweise die allergischen Symptome in den Patienten auslöst, derart appliziert, dass eine Toleranz gegenüber dem Allergen induziert wird [Frew, 2003, Akkoc *et al.*, 2011]. Dazu wird dem Patienten das spezifische Antigen in ansteigenden Dosen subkutan über einen längeren Zeitraum von mindestens drei Jahren verabreicht [Kay, 2000, Frew, 2003, Akkoc *et al.*, 2011]. Die SIT wird erfolgreich bei der Behandlung von IgE-vermittelten Krankheiten wie der allergischen Rhinitis, der Hypersensitivität gegenüber Wespen- und Bienengift und bei allergischem Asthma eingesetzt. Die Immuntherapie bei Heuschnupfenpatienten verbessert das saisonale Asthma und die bronchiale Hyperreaktivität [Till *et al.*, 2004].

Der Funktionsmechanismus der SIT ist noch nicht vollständig geklärt. Sie hat unter anderem Effekte auf die Produktion allergenspezifischer Antikörper. Während der initialen Phase der



SIT steigert das allergenspezifische IgE zunächst an, fällt allerdings im weiteren Verlauf der Therapie auf das Niveau vor der Behandlung oder sogar noch weiter darunter ab [Creticos *et al.*, 1984]. Die SIT induziert ebenfalls die Produktion von IgG-Antikörpern, die als blockierende Antikörper wirken. Des Weiteren werden die allergenspezifischen T-Zellantworten durch die SIT beeinflusst. Bei einer erfolgreichen Behandlung kommt es zu einer Reduktion der T-Zell- und Eosinophilen-Rekrutierung zum Entzündungsherd [Frew, 2003]. Außerdem kommt es zu einer Verschiebung der T-Zell-Balance von einer von Th2-Zellen dominierten Immunantwort hin zu einer eher von Th1-Zellen getragenen Antwort. Weiterhin werden regulatorische T-Zellen induziert, welche die T-Zell-Proliferation und die Zytokin-Produktion inhibieren [Durham, 1999, Frew, 2003, Till *et al.*, 2004, Akkoc *et al.*, 2011]. Es wurde gezeigt, dass es im Laufe einer erfolgreichen SIT zu einer IL-10-Produktion durch regulatorische T-Zellen kommt [Bellinghausen *et al.*, 1997, Akdis *et al.*, 1998, Till *et al.*, 2004]. Das Zytokin IL-10 hat verschiedene antiallergische Eigenschaften wie die Suppression von Mastzellen, Eosinophilen und T-Zellen. Außerdem wirkt IL-10 auch auf B-Zellen [Till *et al.*, 2004], indem es einen Klassenwechsel induziert, der bewirkt, dass allergenspezifische B-Zellen IgG4-Antikörper anstelle von IgE produzieren. Das IgG4 blockiert die Bindung des Antigens an IgE auf Mastzellen und Basophilen und somit die darauf folgende Degranulierung und Histaminfreisetzung [Till *et al.*, 2004, Akkoc *et al.*, 2011]. Auf diese Weise kann Toleranz gegenüber dem verwendeten Antigen induziert und die allergischen Symptome vermindert werden [Akkoc *et al.*, 2011].

Neben der SIT existieren einige medikamentöse Therapien zur Behandlung von allergischem Asthma, wie z.B. die Applikation von Kortikosteroiden. Diese supprimieren die Atemwegsinfektion und lindern die durch das Asthma bedingten Bronchospasmen. Allerdings werden hier nur die Symptome behandelt und das Asthma nicht kausal geheilt [Frew, 2003]. Die SIT hingegen ermöglicht die Veränderung der Immunantwort und eine Inhibition der allergischen Immunreaktionen. Allerdings ist diese Art der Therapie nicht in allen Patienten wirksam und führt nur in seltenen Fällen zu einer kompletten Verminderung der Symptome [Lewis, 2002, Frew, 2003, Van Oosterhout *et al.*, 1998]. Des Weiteren kann es bei einigen Patienten zu unerwünschten Nebeneffekten wie anaphylaktischen Reaktionen kommen [Kay, 2000, Lewis, 2002].

## 1.2 Immuntherapie mit Hilfe der biolistischen DNA-Immunisierung

Neben den zuvor erwähnten Nebeneffekten spielen auch andere Faktoren eine limitierende Rolle für die Wirksamkeit der SIT. Die Angst vor Spritzen hält viele Patienten davon ab, sich einer Desensibilisierung oder einer anderen Art der Behandlung, bei der das Medikament gespritzt werden muss, zu unterziehen bzw. die Therapie bis zum Ende durchzuführen [Nir *et al.*, 2003, Kendall *et al.*, 2006]. Herkömmliche Therapien wie die SIT scheitern oft auch aufgrund der Tatsache, dass Patienten sie wegen der langen Dauer von 3 Jahren vorzeitig abbrechen [Kendall *et al.*, 2006]. Des Weiteren kann es bei den herkömmlichen Behandlungsmethoden zu schwerwiegenden Nebenwirkungen kommen. Die Injektion des Medikaments mit Hilfe von Nadeln birgt auch ein Risiko für denjenigen, der die Spritze verabreicht, sich mit anderen Erkrankungen wie z. B. Hepatitis C oder HIV zu infizieren [Chen *et al.*, 2002]. Es ist daher wichtig alternative Behandlungsarten bzw. weitere Routen der Desensibilisierung für die Behandlung von Typ-I Allergien zu etablieren. Die Desensibilisierung mit dem Allergen in Proteinform hat außerdem weitere Nachteile. Um eine Immunreaktion gegen ein körperfremdes Protein zu induzieren, muss es aufgereinigt werden. Die Aufreinigung eines Proteins in ausreichenden Mengen ist zeitaufwendig und teilweise schwierig.

Eine alternative Art der Immunisierung stellt daher die Behandlung mit allergenkodierender Plasmid-DNA dar. Die DNA kann hierbei intradermal oder intramuskulär injiziert werden. Eine Immunantwort gegen ein körperfremdes Protein kann aber auch durch eine Applikation von mit antigenkodierender DNA beschichteten Goldpartikel direkt auf die Haut induziert werden [Tang *et al.*, 1992]. Hierbei werden mit Hilfe eines biolistischen Systems unter Verwendung von Heliumdruck Zellen der Haut direkt mit der Plasmid-DNA transfiziert. [Tang *et al.*, 1992, Porgador *et al.*, 1998]. Im Vergleich mit einer intramuskulären oder intradermalen Immunisierung werden bei dieser Methode zehn bis hundertmal geringere DNA-Mengen benötigt, um eine effektive Immunantwort auszulösen, da bei den beiden erstgenannten Applikationswegen die Plasmide aktiv durch die Zellen aufgenommen werden müssen [Fynan *et al.*, 1993, Pertmer *et al.*, 1995]. Des Weiteren spielt die extrazelluläre Degradation durch Exonukleasen eine wichtige Rolle, da durch diese DNA abgebaut werden kann, bevor sie letztendlich in die Zellen gelangt [Barry *et al.*, 1999]. Die erreichten Transfektionsraten sind daher bei der biolistischen DNA-Immunisierung wesentlich höher [Scheiblhofer *et al.*, 2006].

Aus den genannten Gründen könnte die biolistische Immunisierung eine effiziente, schmerzfreie und sichere alternative Therapieform zu anderen Immuntherapien darstellen, bei denen mit Hilfe von Spritzen immunisiert wird [Tang *et al.*, 1992, Chen *et al.*, 2002, Kendall *et al.*, 2006]. Die Applikation der Plasmid-DNA über die Haut hat weitere Vorteile, da sie ein sensitives Immunorgan und somit ein geeignetes Ziel für die Administration von Vakzinen ist. In der Epidermis sind üblicherweise keine Blutgefäße und sensorische Nervenenden lokalisiert, was ein wichtiges Kriterium für diese Art der Immunisierung ist [Chen *et al.*, 2002]. In der Haut ist ein Netzwerk aus antigenpräsentierenden Zellen und anderen Zellen, die eine wichtige Rolle bei Immunantworten spielen, vorhanden [Chen *et al.*, 2002]. Ziel der DNA-Immunisierung sind vor allem die in der Epidermis vorhandenen Keratinozyten, Melanozyten und Langerhanszellen. [Chen *et al.*, 2002]. Die darunter liegende Dermis beinhaltet außerdem dermale Dendritische Zellen (DCs), die ein wichtiges Ziel für Immuntherapien darstellen [Chen *et al.*, 2002]. Die Langerhans Zellen und die dermalen DCs haben die Fähigkeit aus der Haut in die regionalen Lymphknoten auszuwandern, wo sie als potente antigenpräsentierende Zellen wirken und T-Zellen aktivieren können [Condon *et al.*, 1996, Kendall *et al.*, 2006].

Die im Rahmen einer DNA-Immunisierung zu induzierende Transgenexpression kann unter der Kontrolle verschiedener Promotoren durchgeführt werden. Wird das Transgen unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven, viralen Promotors wie z.B. dem CMV-Promotor exprimiert, können alle transfizierten Zellen das jeweilige Transgen exprimieren. Bei der DNA-Immunisierung mit Hilfe der Genpistole gelangt die Plasmid-DNA direkt ins Zytoplasma oder bestenfalls sogar direkt in den Zellkern der antigenpräsentierenden Zellen der Haut. Diese direkte Transfektion von DCs mit antigenkodierender Plasmid-DNA resultiert in einer endogenen Produktion des als Antigen wirkenden Proteins und es kommt in der Folge zu einer Präsentation antigener Peptide über MHC („major histocompatibility complex“-Klasse-I-Moleküle und damit zu einer Aktivierung CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T Zellen [Condon *et al.*, 1996]. Durch den Beschuss mit der Plasmid-DNA werden aber auch Hautzellen, insbesondere Keratinozyten, transfiziert, die das von dem Plasmidvektor kodierte Protein synthetisieren und entweder durch aktive Sekretion oder nach Zellschädigung infolge nekrotischen oder apoptotischen Absterbens freisetzen können. Das freigesetzte Antigen kann im Anschluss von DCs aufgenommen und prozessiert werden [Maecker *et al.*, 1997]. In Folge dessen kommt es zu einer von MHC-Klasse-II-Molekülen restringierten Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen [Donnelly *et al.*, 1997]. Ein weiterer Effekt, der eine Rolle bei der DNA-Immunisierung spielt, ist die sogenannte Kreuzpräsentation. Exogene Antigene können dabei unter

bestimmten Umständen auch über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden [Rock und Shen 2005].

Für eine effektive DNA-Immunisierung könnte es von Vorteil sein die Transgenexpression nur auf DCs als potenteste antigenpräsentierende Zellen zu beschränken. Durch die Limitierung der Antigen-Expression auf DCs könnte es vermieden werden, dass andere Zellen das Antigen freisetzen, welches dann von antigenpräsentierenden Zellen internalisiert und präsentiert würde. Durch die Verwendung eines DC-fokussierten Promotors würde die Menge an freiem Antigen somit minimiert, was auch eine Reduktion des anaphylaktischen Potentials zur Folge hätte. Zu diesem Zweck ist die Verwendung eines möglichst DC-spezifischen Promotors unerlässlich. Der Fascin-Promotor stellt einen solchen Promotor dar, der eine starke Transgen-Expression selektiv in DCs erlaubt. Das Aktinbündelungs-Protein Fascin hat eine wichtige Funktion bei der Ausbildung der Dendriten reifer DCs [Ross *et al.*, 1998, 2003]. Unreife DCs exprimieren kein Fascin. Nach Aktivierung der DCs kommt es im Verlauf ihrer Ausreifung dann zu einer deutlich verstärkten Fascin-Expression [Ross *et al.*, 1998, 2000]. Aus diesem Grund und aufgrund dieser Tatsache, dass Fascin ein Strukturprotein ist, das in maturen DCs in großen Mengen produziert wird, wurde eine starke Genexpression in reifen DCs beobachtet, wenn der Fascin-Promotor zur Kontrolle der Transgenexpression verwendet wurde [Ross *et al.*, 2003]. Eine Fascin-Expression konnte außer in DCs noch in wenigen nicht-hämatopoetischen Zelltypen wie neuronalen Gliazellen, Kapillar-Endothelzellen und follikulären Dendritischen Zellen nachgewiesen werden [Ross *et al.*, 1998, Jaffe *et al.*, 1998]. Bei der biolistischen DNA-Immunisierung spielen allerdings von den eben genannten Zellen nur die dermalen DC und die Langerhanszellen der Haut eine Rolle. Die anderen Zellen sind hierbei nicht von Bedeutung, da nur Zellen der Haut direkt transfiziert werden können. Daher eignet sich der Fascin-Promotor im Rahmen der biolistischen DNA-Immunisierung für eine auf DCs fokussierte Transgenexpression.

Bei vergleichenden Analysen, die unter Verwendung des Modellantigens  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ Gal) durchgeführt wurden, welches unter Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors sowie des DC-spezifischen Fascin-Promotors im Rahmen einer biolistischen DNA-Immunisierung exprimiert wurde, wurde gezeigt, dass die DNA-Immunisierung mit dem CMV-Promotor zu einer deutlichen humoralen Immunantwort führt, wobei mehr IgG1 als IgG2a im Serum der immunisierten Mäuse nachgewiesen wurden [Sudowe *et al.*, 2003]. Auf zellulärer Ebene wurde eine gemischte Th1/Th2 Antwort aufgezeigt, die jedoch deutlich kompartimentiert war. In den drainierenden Lymphknoten der transfizierten Hautareale wurde aufgrund der Präsenz IL-4-produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine durch Th2-Zellen dominierte

Immunantwort nachgewiesen, während in der Milz IFN- $\gamma$ -produzierende Th1-Zellen vorherrschend waren. Eine biolistische Immunisierung mit  $\beta$ Gal unter Kontrolle des Fascin-Promotors (pFascin- $\beta$ Gal) hingegen führte zur Induktion einer eindeutigen Th1-Antwort, die durch eine starke IFN- $\gamma$ -Produktion durch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in der Milz und auch den drainierenden Lymphknoten gekennzeichnet war. Des Weiteren wurde IgG2a als dominierender Immunglobulinsubtyp im Serum nachgewiesen [Sudowe *et al.*, 2003]. Folgeexperimente im Mausmodell der IgE-vermittelten Soforttyp-Allergie demonstrierten, dass eine prophylaktische biolistische Vakzinierung mit  $\beta$ Gal-kodierender Plasmid-DNA sowohl bei Verwendung des CMV- als auch des Fascin-Promotors geeignet war, um die antigenspezifische IgE- und IgG1-Antwort von anschließend mit Protein sensibilisierten Mäusen zu inhibieren [Ludwig-Portugall *et al.*, 2004]. Die Bildung von IgG2a hingegen wurde in den vakzinierten Tieren deutlich gesteigert. Anhand der Analyse der Zytokin-Produktion durch antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde im Vergleich zu den nicht vakzinierten Kontrolltieren, die eine deutlich polarisierte Th2-Immunantwort aufwiesen, gezeigt, dass es in den vakzinierten Mäusen zu einer Verschiebung der T-Helferzell-Induktion hin zu einer gemischten Th1-/Th2-Antwort kam. Es wurde außerdem eine große Anzahl an CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ -produzierenden zytotoxischen T Zellen nachgewiesen [Ludwig-Portugall *et al.*, 2004]. Die therapeutische biolistische DNA-Immunisierung von Mäusen, die zuvor bereits mit dem Protein sensibilisiert worden waren und die aufgrund dessen deutliche IgE-Titer im Serum aufwiesen, führte dazu, dass transient eine weitere Erhöhung der IgE-Produktion durch nachfolgende Provokationen verhindert wurden [Sudowe *et al.*, 2006]. Des Weiteren verhinderte die prophylaktische DNA-Immunisierung die Entwicklung einer Th2 vermittelten Atemwegshyperreaktivität (AHR), induzierte aber eine Th1 vermittelte Atemwegshyperreaktivität und eine starke Neutrophilie. Eine DNA-Immunisierung inhibiert also potent systemische und lokale Th2-Antworten führt aber gleichzeitig zu einer Th1 vermittelten Immunantwort und induziert zytotoxische T-Zellen [Zindler *et al.*, 2008]. Die Bildung von IgE ist wie bereits erwähnt ein entscheidender Vorgang bei der Entwicklung von Allergien und ihre Inhibition daher ein wichtiges Ziel von Therapien [Broide, 2001].

Die Inhibition von allergischen Th2-Immunantworten und die Verschiebung hin zu einer Th1-polarisierten Immunantwort könnte daher einen Vorteil bei der Behandlung des allergischen Asthmas darstellen. Auch der Fascin-Promotor könnte hierbei eine wichtige Rolle spielen. Aufgrund der Limitierung der Expression des Antigens auf DCs präsentieren nur diese Zellen, bei denen es sich um die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen handelt, T-Zellen das

Allergen. Dies könnte dabei helfen eine Überaktivierung des Immunsystems zu verhindern und unerwünschte Immunreaktionen zu reduzieren [Sudowe *et al.*, 2006].

### **1.3 Dendritische Zellen**

Dendritische Zellen sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems [Steinbrink *et al.*, 1997]. Sie spielen eine wichtige Rolle sowohl bei der Erlangung von Immunität als auch bei der Aufrechterhaltung der Toleranz [Li *et al.*, 2008]. Eine wichtige Aufgabe der DCs ist die Aufnahme von Antigenen, die Antigenprozessierung und die Induktion der Differenzierung naiver T-Zellen zu T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen [De Smedt *et al.*, 1997, Wu und Dakic, 2004]. Das Vorkommen von DCs in lymphoiden und nicht-lymphoiden Geweben und ihre Fähigkeit nach der Stimulation mit Antigen durch das Blut und die Lymphe zu den peripheren lymphatischen Organen zu zirkulieren, spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion von Immunantworten gegen eindringende Pathogene [Steinbrink *et al.*, 1997, Strobl und Knapp, 1999]. Hauptsächlich findet man DCs an der Grenzschicht zwischen Körperoberflächen und der Umgebung. Dort können sie Antigene auf ihre potentielle Gefährdung für den Organismus hin untersuchen. Im respiratorischen Trakt beispielsweise bilden DCs ein dichtes Netzwerk und können Immunität gegen inhalierte schädliche Antigene oder Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen auslösen. Die Aufrechterhaltung der Homöostase ist wichtig, damit es nicht zu einer Entzündung der Atemwege oder zu Reaktionen auf harmlose Antigene kommt, wie es beim allergischen Asthma der Fall ist [von Garnier und Nicod, 2009]. Antigenpräsentierende Zellen spielen also eine kritische Rolle sowohl bei der Initiierung als auch bei der Kontrolle von allergischem Asthma.

Dendritische Zellen stammen von hämatopoetischen Vorläuferzellen ab und kommen als unreife DCs in peripheren nichtlymphatischen Organen vor, wo sie wie zuvor erwähnt, das umliegende Gewebe nach fremden Antigenen und Pathogenen durchsuchen [Strobel und Knapp, 1999, Sato und Fujita, 2007]. DCs haben eine Reihe von Rezeptoren zur Antigenerkennung auf ihrer Oberfläche und können Fremdpartikel oder -moleküle mittels Phagozytose oder Endozytose aufnehmen [Iwasaki und Medzhitov, 2004, Novak und Bieber, 2008].

Als Folge einer Aktivierung, die oftmals auch durch die Bindung eines Antigens an die Rezeptoren auf der Oberfläche der DCs ausgelöst werden kann, wandern DCs aus den nicht-lymphatischen Geweben zu den T-Zell-Bereichen sekundärer lymphoider Organe wie den drainierenden Lymphknoten oder der Milz. Währenddessen durchlaufen sie phänotypische und funktionelle Veränderungen, die als Ausreifung bezeichnet werden. Diese geht einher mit der Steigerung der Expression von an der Antigenpräsentation beteiligten MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen sowie von kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86. Gleichzeitig verlieren die DCs ihre Fähigkeit Antigene aufzunehmen und zu prozessieren [Strobel und Knap, 1999, Smits *et al.*, 2005].

T-Zellen erkennen Antigenfragmente, die auf der Oberfläche von DCs an MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden sind. Intrazelluläre Antigene werden im Zytosol der DCs zu Peptiden prozessiert und über MHC-Klasse-I  $CD8^+$  T-Zellen präsentiert. Diese werden daraufhin zur Proliferation angeregt, differenzieren in der Regel zu zytotoxischen T-Zellen und können in dieser Funktion Zielzellen direkt abtöten. Extrazelluläre Antigene, die von DCs aufgenommen werden, werden in endosomalen Kompartimenten ebenfalls zu Peptidfragmenten prozessiert und assoziiert mit MHC-Klasse-II-Molekülen  $CD4^+$  T-Zellen präsentiert. Diese aktivieren T-Zellen wiederum können durch Interaktion mit anderen Zellen wie B-Zellen oder Makrophagen Immunantworten induzieren und steuern [Bancherau und Steinman, 1998].

Seit der ersten Beschreibung von DCs durch Ralph Steinman 1973 wurden verschiedene Subtypen identifiziert. In der Maus wurden basierend auf der Expression von CD4, CD8, CD11c, CD205 und CD45RO sechs verschiedene Subtypen charakterisiert. Diese können unterteilt werden in plasmazytoide DC (pDC), die durch die Expression von CD45RO gekennzeichnet sind, und in fünf Typen konventioneller DC (cDC). Hierbei handelt es sich um drei aus dem Blut abgeleitete Subtypen, die vor allem in der Milz vorkommen ( $CD4^+$  DC,  $CD8^+$  DC, und  $CD4^+CD8^-$  DC) und zwei aus dem Gewebe abgeleitete Subtypen, die Langerhanszellen in der Haut und die interstitiellen DCs in anderen Geweben [Dullaers und Thielemans, 2006].

pDCs zirkulieren im Blut und durch lymphoide Gewebe und erlangen eine typische DC-Morphologie erst nach ihrer Aktivierung. Diese geht einher mit einer für diese Zellen typischen Freisetzung von Typ I-Interferonen [Villadangos und Schnorrer, 2007]. pDCs haben die Fähigkeit regulatorische T-Zellen (Tregs) zu generieren und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Prävention von Allergien und der Entwicklung von allergischem Asthma [Kool und Lambrecht, 2007, Palomares *et al.*, 2010]. Des Weiteren können sie

Allergene über hochaffine Rezeptoren für IgE aufnehmen und diese CD8<sup>+</sup> T-Zellen kreuzpräsentieren [Novak und Bieber, 2008].

Neben ihrer Fähigkeit Immunantworten zu stimulieren können DCs unter verschiedenen Bedingungen zu tolerogenisierenden antigenpräsentierenden Zellen umgewandelt werden [Adorini *et al.*, 2004].

Tolerogene DCs haben z.B. eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Toleranz bei Transplantationen [Li *et al.*, 2008]. Sie verbleiben in einem unreifen Status und sind nicht sensitiv für eine Ausreifung [Li *et al.*, 2008]. Diese DCs exprimieren unter anderem verstärkt das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und induzieren Apoptose in den T-Zellen des Transplantats. Des Weiteren induzieren sie regulatorische T-Zellen [Li *et al.*, 2008].

Ein wichtiger Faktor bei der Differenzierung von DCs zu tolerogenen DCs ist IL-10. Unreife DCs sind *in vitro* im Gegensatz zu ausgereiften DCs sensitiv für eine Behandlung mit IL-10 [Steinbrink *et al.*, 1997]. Die Behandlung der DCs mit IL-10 resultiert in einer reduzierten Oberflächenexpression von MHC-Klass-I- und -II-Molekülen sowie kostimulatorischer Moleküle der B7 Familie. Des Weiteren wird die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine verhindert. Aufgrund der reduzierten MHC- und B7-Expression können mit IL-10 tolerogenisierte DCs T-Zellen schlechter stimulieren als unbehandelte DCs. Mit IL-10 behandelte DCs verbleiben aber nicht nur in einem unreifen Zustand. IL-10 moduliert die Ausreifung derart, dass sie T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften induzieren [Enk, 2005, Steinbrink *et al.*, 1997]. Die Fähigkeit Th1-Antworten auszulösen ist bei DCs die in Anwesenheit von IL-10 ausgereift wurden, vermindert. Sie können kein IL-12 produzieren, welches wichtig für die Entwicklung von Th1-Zellen ist. Dies führt somit zu einer bevorzugten Entwicklung von Th2-Zellen. [De Smedt *et al.*, 1997].

Eine therapeutische Verwendung IL-10-modifizierter DCs wird diskutiert, seitdem herausgefunden wurde, dass eine Injektion von *in vitro* generierten IL-10-DCs Autoimmunreaktionen in einem Mausmodell der Multiplen Sklerose (EAE) unterdrücken kann und Transplantatabstoßungen in einem Mausmodell der GVHD („gift-versus host disease“) verzögert [Mueller *et al.*, 2002, Sato *et al.*, 2003].

Ein weiterer wichtiger Faktor, der eine immunsuppressive Wirkung auf DCs hat, ist TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  inhibiert die Aktivierung und Ausreifung von DCs *in vitro*. Es wirkt der verstärkten Expression von kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche von aktivierten DCs entgegen, was zu einem verminderten Potenzial zur Aktivierung von T-Zellen führt.



Einige Subpopulationen von DCs in nicht-lymphoiden Geweben hingegen werden positiv von TGF- $\beta$  reguliert. Es gibt Studien, die zeigen, dass epitheliale DCs und Langerhanszellen eine Stimulation durch TGF- $\beta$  für ihre Entwicklung und Funktion benötigen. TGF- $\beta$  steigert die Antigenprozessierung und die Fähigkeit dieser Zellen T-Zellen zu stimulieren [Strobel und Knapp, 1999].

Die Fähigkeit von DCs, T-Zellen nicht nur zu aktivieren, sondern auch deren Differenzierung zu beeinflussen, macht sie zum wichtigen Ziel für Immuntherapien. DCs können demnach die Polarisierung einer T-Zellantwort von einer die Allergie fördernden Th2-Antwort hin zu einer eine Allergie hemmenden Th1-Antwort induzieren. Sie können aber auch direkt T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften induzieren.

### 1.4 Th1- und Th2-Zellen

T-Helferzellen spielen eine wichtige Rolle bei Immunantworten, da sie Antigen-Peptide, die von DCs prozessiert werden, erkennen [Durham, 1999]. T-Zellen benötigen drei Signale von DCs zu ihrer Aktivierung und Differenzierung. Das erste Signal wird durch eine Interaktion des antigenspezifischen T-Zellrezeptors mit dem Peptid-MHC-Komplex geliefert, der auf der Oberfläche einer DC präsentiert wird. Das zweite kostimulatorische Signal ist nicht antigenspezifisch. Ein solcher kostimulatorischer Signalweg stellt z.B. die Interaktion der Moleküle CD28, die auf T-Zellen exprimiert werden, und ihrer Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), die von DCs exprimiert werden, dar. Die Bindung des CD80-Moleküls auf der Seite der DC mit dem CD28-Molekül auf der Oberfläche der T-Zelle liefert ein zweites Signal, welches T-Zellen zur Proliferation und zur Sekretion von IL-2 anregt. Fehlt dieses zweite kostimulatorische Signal im Rahmen der Antigenpräsentation kann eine Anergie in den T-Zellen induziert werden. Wird das zweite Signal durch eine Interaktion von CTLA-4 („Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4“) mit CD86 vermittelt, wird ein negatives Signal auf die T-Zelle übermittelt, welches zur Inaktivierung oder Suppression der T-Zelle führt [Keane-Myers *et al.*, 1997].

T-Zellen werden auf der Grundlage des Spektrums der von ihnen sezernierten Zytokine, in verschiedene Subtypen unterschieden. Unter anderem können sie in Th1- und Th2-Zellen differenziert werden [Durham, 1999]. Bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide oder Peptidoglykan induzieren, durch die Bindung an Toll Like Rezeptoren (TLR), die Produktion von IL-12, und IL-18 in DCs und Makrophagen. Eine Anwesenheit von IL-12 bei der

Aktivierung durch DCs führt zu einer Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-Zellen. Dies dient als drittes Signal [Bancherau und Steinman, 1998, Bancherau *et al.*, 2000]. Th1-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen, Zytotoxizität und Hypersensitivitätsreaktionen vom verzögerten Typ [Jutel *et al.*, 2003]. Sie produzieren nach ihrer Aktivierung hauptsächlich IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  und - $\beta$  und induzieren starke zelluläre Immunreaktionen [Durham, 1999, Van Rijt und Lambrecht, 2001]. Die genannten Typ-1 Zytokine aktivieren zytotoxische und phagozytotische Funktionen in Effektorzellen wie zytotoxischen T Zellen, natürlichen Killer-Zellen und Makrophagen [Kalinski *et al.*, 1999].

Die Anwesenheit von IL-4 als drittes Signal bei der T-Zellaktivierung führt hingegen zu einer Differenzierung von Th2-Zellen [Bancherau und Steinman, 1998]. Th2-Zellen und die von ihnen sezernierten Zytokine können eine starke Antikörperantwort und eine Eosinophilie herbeiführen. Eine verstärkte Rekrutierung von Eosinophilen ist daher charakteristisch für eine allergische Immunantwort [Jutel und Akdis, 2011, Rosenberg *et al.*, 2007]. Th2-Zellen produzieren hauptsächlich IL-4 und IL-5 aber auch IL-9 und IL-13 [Durham, 1999, Till *et al.*, 2004, Kay, 2000]. Die allergiefördernden Effekte dieser Zytokine sind vielfältig [Till *et al.*, 2004, Kay, 2000]. IL-4 und IL-13 verursachen in B-Zellen einen Immunglobulin-Klassenwechsel, der zu einer IgE-Synthese führt [Durham, 1999]. IL-5 und IL-9 wirken auf Eosinophile und fördern deren Differenzierung und Aktivierung [Durham, 1999, Kay, 2000]. Des Weiteren fördert IL-5 das Verbleiben der Eosinophilen im betroffenen Gewebe durch eine Inhibition der Apoptose [Durham, 1999]. IL-3 fördert ebenfalls die Ausreifung der Eosinophilen und deren Aktivierung, ist allerdings nicht wie IL-5 selektiv für diese Zellen [Durham, 1999]. IL-3, IL-4 und SCF (Stammzellfaktor) beeinflussen die Mastzellentwicklung, IL-9 und IL-13 fördern die Atemwegshyperreaktivität und IL-4, IL-9 und IL-13 die Schleimproduktion [Kay, 2000].

Faktoren, die bestimmen, ob eine Th1- oder Th2-Antwort induziert wird, sind abhängig von der Aufnahme, der Route und der Beschaffenheit des Antigens, sowie der Art der APC und dem Zytokinmilieu während der Antigenpräsentation. Außerdem sind sie abhängig von dem jeweiligen Individuum [Till *et al.*, 2004, Lambrecht, 2001]. Außerdem spielt die Dosis des Antigens eine Rolle. Hohe Antigendosen z.B. können bevorzugt die Induktion einer Th1-vermittelten Antwort induzieren. Niedrige Dosen eines Antigens hingegen induzieren bevorzugt die Entwicklung von Th2-Zellen [Secrist *et al.*, 1993, Pfeiffer *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 1996, Sakai *et al.*, 1999].

Die Rolle von T-Zellen bei der Entwicklung allergischer Immunantworten macht sie zum Ziel für Immuntherapien durch z.B. die Verschiebung der Immunantwort von einem Th2-

Phänotyp hin zu einem Th1-Phänotyp, die Inhibition der Antigenpräsentation und die Supprimierung der Immunantwort durch T-Zellen mit regulatorischer Aktivität [Till *et al.*, 2004].

## **1.5 Regulatorische T-Zellen und die immunregulatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$**

Regulatorische T-Zellen (Treg) spielen eine wichtige Rolle beim Schutz vor Autoimmunerkrankungen und auch bei der Prävention von Allergien [Robinson *et al.*, 2004]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Treg für die Induktion und Aufrechterhaltung von Immuntoleranz gegen harmlose und körpereigene Antigene essenziell sind. Die Induktion von Treg spielt als Therapieform für die Behandlung und Heilung allergischer Erkrankungen daher eine wichtige Rolle [Palomares *et al.*, 2010]. Treg können Suppression auf zwei unterschiedlichen Wegen vermitteln: zum einen zellkontaktabhängig und zum anderen durch soluble Faktoren wie IL-10 und TGF- $\beta$  [Buckner und Ziegler, 2004].

Murine Treg sind gekennzeichnet durch die Expression von CD25, der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors, sowie CTLA-4, GITR („glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor“) und FoxP3 („forkhead box P3“) [Jonuleit und Schmitt, 2003, Workman *et al.*, 2009]. Treg können in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erstmals 1995 von Sakaguchi beschriebenen natürlich vorkommenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg (nTreg), die sich im Thymus kurz nach der Geburt entwickeln, und die induzierten Treg (iTreg), die in der Peripherie aus naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen nach Antigenstimulation unter tolerogenen Bedingungen entstehen [Workman *et al.*, 2009, Akkoc *et al.*, 2011]. Die natürlich vorkommenden Treg spielen eine wichtige Rolle bei der peripheren Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen oder harmlosen Antigenen sowie symbiotischen Bakterien [Lewis, 2002]. Sie supprimieren die Aktivierung konventioneller T-Zellen zellkontaktabhängig, aber unabhängig von IL-10 und TGF- $\beta$ . nTreg liegen normalerweise in einem anergen Zustand vor. Ihre Aktivierung erfolgt antigenspezifisch über den T-Zellrezeptor. Nach ihrer Aktivierung sind nTreg hypoproliferativ und supprimieren die Proliferation und IL-2-Produktion von naiven und Gedächtnis-T-Zellen antigenunspezifisch [Buckner und Ziegler, 2004, Jonuleit *et al.*, 2001].

Die iTreg differenzieren aus naiven Vorläufern und sind spezifisch für Antigene, die nicht im Thymus präsentiert werden, wie z.B. Nahrungsmittelantigene, Bakterien und Pathogene. Sie supprimieren die Aktivierung konventioneller T-Zellen zytokinabhängig und können in Tr1-

und Th3-Zellen unterschieden werden [Chen *et al.* 1994, Buckner und Ziegler, 2004]. Tr1-Zellen werden durch IL-10 induziert und Th3-Zellen durch TGF- $\beta$  [Workman *et al.*, 2009, Jonuleit und Schmitt, 2003].

Allergenspezifische Tr1-Zellen sind ein dominierender Zelltyp in gesunden Individuen. Sie verhindern ungewollte Immunreaktionen auf nichtpathogene Umweltantigene, die Allergien induzieren können [Akkoc *et al.*, 2011]. In gesunden und allergischen Individuen findet man die drei T-Zelltypen Th1-, Th2- und Tr1-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen [Akdis *et al.*, 2004]. Eine veränderte Balance des Verhältnisses von Th2- zu Tr1-Zellen kann die Entwicklung von Allergien fördern oder vor Allergie schützen, je nach vorherrschendem Zelltyp [Akdis *et al.*, 2004, Akkoc *et al.*, 2011]. Speziell Tr1-Zellen spielen also eine Schlüsselrolle bei der peripheren Toleranz gegen Allergene, Auto-, Transplantat- und Tumorentigene [Akdis, 2008]. Tr1 Zellen können durch die SIT induziert werden [Akkoc *et al.*, 2011] und potent Th2-Antworten inhibieren sowie einen Wechsel von einer IgE-Produktion hin zu einer Produktion von protektiven IgG4-Antikörpern induzieren [Robinson *et al.*, 2004]. Des Weiteren supprimieren Treg allergische Inflammationen direkt, indem sie auf Mastzellen, Basophile und Eosinophile wirken. Tregs verhindern außerdem die Apoptose von Keratinozyten und bronchialen Epithelzellen und vermeiden somit die Schädigung von Gewebe [Palomares *et al.*, 2010]. Weitere Zellen, auf die IL-10 wirkt, sind B-Zellen, zytotoxische T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen [de Waal Malefyt *et al.*, 1991]. Die Wirkung von IL-10 auf Makrophagen ist darauf zurückzuführen, dass diese die IFN- $\gamma$ -Produktion von Th1-Zellen inhibieren [Fiorentino *et al.*, 1991]. IL-10 fördert die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit von IL-2 und erhöht deren zytolytische Aktivität [Chen und Zlotnik, 1991]. Einen weiteren stimulierenden Effekt hat IL-10 auf Mastzellen. In Kombination mit IL-3 oder IL-4 fördert es deren Wachstum [Thompson-Snipes *et al.*, 1991]. B-Zellen zeigen eine gesteigerte Expression von MHC-II und eine erhöhte Viabilität, wenn sie *in vitro* in Anwesenheit von IL-10 kultiviert werden [Go *et al.*, 1990].

Die CD4<sup>+</sup> Th3 Zellen sezernieren hauptsächlich TGF- $\beta$ , jedoch kein IL-2, IL-4 und wenig IL-10 [Inobe *et al.*, 1998, Buckner und Ziegler, 2004]. Sie wirken suppressiv auf Th1-Zellen und haben einen Effekt bei der Kontrolle verschiedener Autoimmunerkrankungen und der Abstoßung von Allotransplantaten. Sie spielen aber auch eine wichtige Rolle bei der oralen Toleranz [Chen *et al.*, 1994, 1998, Josien *et al.*, 1998]. *In vitro* können Th3-Zellen durch die Stimulation von naiven T-Zellen mit TGF- $\beta$  generiert werden [Seder *et al.*, 1998].

TGF- $\beta$  hat eine wichtige Funktion bei der Umwandlung naiver CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen durch die Induktion von FoxP3 [Akdis, 2008]. TGF- $\beta$  vermittelt also die periphere Umwandlung von naiven T-Zellen in FoxP3<sup>+</sup> Treg [Palomares *et al.*, 2010].

Es wurde gezeigt, dass TGF- $\beta$  die Expression der Transkriptionsfaktoren RUNX1 (Runt-related transcription factor“) und RUNX3 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert. Diese binden an RUNX Bindungsstellen des FoxP3-Promotors und induzieren so die FoxP3-Expression [Akoc *et al.*, 2011]. FoxP3 ist der Haupt-Transkriptionsfaktor für die Entwicklung und Funktion von Treg [Klunker *et al.*, 2009]. Mutationen des FoxP3 Gens führen bei Mäusen zur Entwicklung einer allergischen Atemwegsinfektion, dem Hyper-IgE-Syndrom, einer Eosinophilie sowie zu Autoimmunerkrankungen. FoxP3 Mutationen beim Menschen können ebenfalls das Hyper IgE-Syndrom und Ekzeme auslösen [Chatila, 2005].

Das immunmodulatorische Zytokin TGF- $\beta$  hat außerdem noch weitere Effekte. Es hemmt die Proliferation von hämatopoetischen Zellen, von T- und B-Zellen und hat einen Einfluss auf deren Differenzierung. Außerdem hemmt TGF- $\beta$  die IL-2-Produktion [Lingnau *et al.*, 1998, Jutel *et al.*, 2003]. Des Weiteren aktiviert TGF- $\beta$  den tolerogenen Signalweg des Tryptophan-Katabolismus, der durch Indolamin-2,3-Dioxygenase vermittelt wird [Belladonna *et al.*, 2008]. Chen *et al.* zeigten zudem 1998, dass TGF- $\beta$  die Entwicklung immunoregulatorischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* fördert [Chen *et al.*, 1998].

## **1.6 Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)**

Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist das erste und limitierende Enzym des Tryptophan-Katabolismus [Stone und Darlington, 2002]. Sie katalysiert die oxidative Spaltung des Indolrings von Tryptophan und startet so den Abbau dieser essentiellen Aminosäure zu verschiedenen neuroaktiven und immunmodulatorischen Molekülen, den sogenannten Kynureninen [Frumento *et al.*, 2002, Grohmann *et al.*, 2003].

IDO liegt nur als intrazelluläres Protein vor, es gibt keine sekretierte oder extrazelluläre Form [Mellor und Munn, 2004]. Das Protein kann sowohl mit als auch ohne enzymatische Aktivität gebildet werden. Enzymatisch inaktives IDO-Protein kann durch IFN- $\gamma$  aktiviert werden. Die Gen-Transkription wird also in Abhängigkeit von Entzündungsmediatoren kontrolliert und ist auf bestimmte Zelltypen limitiert [Mellor und Munn, 2004, Fallarino *et al.*, 2003, Grohmann *et al.*, 2002, 2003, King und Thomas, 2007]. Die Kontrolle der IDO-Expression ist Zelltyp-spezifisch [Mellor und Munn, 2004]. IDO wird unter anderem von Fibroblasten,

Makrophagen, DCs, Trophoblasten und Epithelzellen exprimiert [Babcock und Carlin, 2000, Mellor und Munn, 2001, King und Thomas, 2007]. Die höchste IDO-Expression kann in Zellen des Immunsystems wie DCs und Makrophagen nachgewiesen werden [Belladonna *et al.*, 2007]. Neben IFN- $\gamma$  wird die IDO-Expression auch durch proinflammatorische Mediatoren wie IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  induziert und durch IL-10 aufrechterhalten [Grohmann *et al.*, 2002, King und Thomas, 2007]. Andere Moleküle wie IL-4, IL-6, IL-13 TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> (Prostaglandin E<sub>2</sub>), SOCS3 („Suppressor of cytokine signaling 3“), Bin1 („bridging integrator 1“) und DAP12 („DNAX-activating protein of molecular mass 12 kilodaltons“) modulieren, abhängig vom Zelltyp und dem vorhandenen Zytokin-Milieu, ebenfalls die IDO-Expression [King und Thomas, 2007]. Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Regulation von IDO ist CTLA-4 [Miwa *et al.*, 2005, Puccetti und Grohmann, 2007, Agaugue *et al.*, 2006]. Grohmann *et al.* zeigten 2002, dass CTLA-4 über die Ligation der B7-Moleküle die Expression der IDO in murinen DCs verstärkt, indem diese dazu konditioniert werden, IFN- $\gamma$  zu produzieren, welches autokrin und parakrin wirkt und die IDO-Produktion fördert [Grohmann *et al.*, 2003]. Solubles CTLA-4 induziert ebenfalls die IDO-Expression über die Ligation an CD80/CD86 [Grohmann *et al.*, 2002]. In einigen Fällen wird IFN- $\gamma$  für die Verstärkung der IDO-Expression benötigt, in anderen nicht. Durch IFN- $\gamma$  vermittelte Signale sind somit nicht essentiell für die CD80/CD86-induzierte Erhöhung der IDO-Expression in DCs [Mellor *et al.*, 2004, Mellor und Munn, 2004, Munn *et al.*, 2004].

IDO spielt eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität [Taylor und Feng, 1991]. Sobald infektiöse Substanzen in das Gewebe eindringen, akkumulieren Leukozyten und Lymphozyten an der Stelle der Infektion und geben Interferone in die Umgebung ab. Diese wiederum induzieren die IDO-Expression in denselben oder anderen Zelltypen. Dadurch kommt es lokal zu einem Abbau von Tryptophan. Durch den Tryptophan-Mangel wird das Wachstum von z.B. Viren, Bakterien und Parasiten inhibiert, da sie diese Aminosäure für ihr Wachstum benötigen [Grohmann *et al.*, 2003]. IDO kann *in vitro* auch durch den Abbau von Tryptophan die Proliferation intrazellulärer Pathogene und Tumorzellen inhibieren [Taylor und Feng, 1991].

IDO exprimierende Zellen haben auch eine wichtige Funktion bei der Entfernung autoreaktiver Zellen und sind mit der Generierung und Aufrechterhaltung von peripherer Toleranz assoziiert [Hwu *et al.*, 2000, Munn *et al.*, 2002]. Der durch IDO vermittelte Tryptophan-Abbau und der damit einhergehende Nährstoffmangel sowie die Akkumulation

von Kynureninen verursachen Stress für die Immunzellen und reduziert deren Zellfunktion [Stone *et al.*, 2002, Fallarino *et al.*, 2006, Munn und Mellor, 2007].

Der durch IDO induzierte Tryptophan-Katabolismus hat aber auch noch andere Effekte. Er spielt eine Rolle bei der Schwangerschaft, bei der Transplantatabstoßung, bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen und bei Allergien [Hayashi *et al.*, 2004]. 1998 zeigten Munn *et al.* dass die Expression von IDO die Abstoßung des Fötus während der Schwangerschaft unterdrücken kann. IDO wird in der Plazenta gebildet und supprimiert T-Zellen, die ansonsten in die Plazenta wandern und dort den Fötus schädigen würden. Die IDO-abhängige Suppression der T-Zell Antworten stellt also einen natürlichen immunomodulatorischen Mechanismus dar, der die maternale T-Zell Immunität gegen fötales Gewebe während der Schwangerschaft verhindert [Munn *et al.*, 1998, Kamimura *et al.*, 1991].

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die IDO suppressive Eigenschaften und Toleranz bei Th1-vermittelten Krankheiten wie im Mausmodell der Multiplen Sklerose, der sogenannten EAE (experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis), EAU (experimentelle Autoimmun-Uveitis) und der Kolitis induziert [Gurtner *et al.*, 2003, Platten *et al.*, 2005, Choi *et al.*, 2006]. Eine erhöhte IDO-Expression durch DCs führt zu einer Inhibition von Th1-Antworten [Orabona *et al.*, 2005, 2006, Fallarino *et al.*, 2003]. Die Inhibition von IDO, in der Maus, durch den IDO-Inhibitor 1-Methyl-Tryptophan erhöht das Vorkommen Th1-vermittelter Krankheiten [Kwidzinski *et al.*, 2005].

Verschiedene Metabolite des Tryptophan-Katabolismus induzieren Apoptose von Th1-, aber nicht Th2-Zellen [Fallarino *et al.*, 2002]. Dadurch kommt es zu einem selektiven Überleben von Th2-Zellen und damit einhergehend zu einer Steigerung der Th2-Zytokin-Produktion [Molano *et al.*, 2008]. Die IDO-Aktivität fördert demnach Th2-vermittelte Immunantworten [Xu *et al.*, 2008].

Andere Studien hingegen haben gezeigt, dass die IDO eine protektive Rolle bei Th2-vermittelten Krankheiten spielen kann. So konnten IDO-exprimierende Zellen in der Lunge die Th2-Antwort in einem Mausmodell des Asthmas inhibieren [Hayashi *et al.*, 2004]. Die IDO-Expression wird u.a. über TLR-4 und -9 *in vivo* und *in vitro* induziert. Die durch TLR-Liganden induzierte IDO-Aktivität inhibiert eine Th1- sowie eine Th2-vermittelte Lungeninflammation [Hayashi *et al.*, 2004].

IDO-exprimierende DCs können auf unterschiedliche Weise T-Zellantworten supprimieren. Die IDO-Expression kann zum einen direkt auf T-Zellen wirken, da aktivierte T-Zellen, die einem Tryptophan-Mangel ausgesetzt werden, in den Zell-Zyklus-Arrest gehen und dann sensibler für Apoptose sind [Munn *et al.*, 1998]. Ein weiterer Effekt ist die durch die

Metabolite des Tryptophan-Abbaus induzierte Apoptose [Fallarino *et al.*, 2002]. Es ist unklar, ob Kynurenine direkt toxisch wirken oder den Zelltod über Rezeptoren vermitteln [Mellor und Munn 2004]. Außer T-Zellen sind auch B-Zellen und NK-Zellen von der durch den Tryptophan-Mangel und die Akkumulation der Kynurenine induzierten Apoptose betroffen, DCs werden dagegen nicht beeinflusst [Terness *et al.*, 2002]. Eine IDO-Expression kann auch direkt regulatorische T-Zellen induzieren [Fallarino *et al.*, 2003]. Der Tryptophan-Mangel und die Akkumulation von Kynureninen kann naive  $CD4^+CD25^-$  T Zellen in  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  regulatorische T-Zellen transformieren [Fallarino *et al.*, 2006].



## **1.7 Ziele der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die bereits etablierte Strategie der biologischen DNA-Immunisierung weiterzuentwickeln und im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung zu evaluieren. In den bisherigen Studien wurde gezeigt, dass eine mit der Genpistole durchgeführte Immunisierung mit Plasmid-DNA, welche das Modell-Allergen  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) unter Kontrolle des Fascin-Promotors kodiert, zu einer Inhibition der durch eine Sensibilisierung ausgelösten Th2-Antwort führt, im Gegenzug allerdings eine potente Th1/Tc1-Antwort auslöst. In Folge der Induktion der Th1- und Tc1-Zellen kommt es nach einer intranasalen Provokation mit dem Antigen zu einer Infiltration von Neutrophilen in die Atemwege sowie zur Auslösung einer AHR.

In dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, ob die zuvor genannten unerwünschten Effekte dieser Form der DNA-Immunisierung durch eine Vakzinierung in Kombination mit einem Plasmid, das für ein immunmodulatorisches Molekül kodiert, inhibiert werden können. Dazu wurde der Effekt einer Koapplikation von  $\beta$ Gal zusammen mit den regulatorischen Zytokinen IL-10 oder TGF- $\beta$  bzw. mit IDO untersucht. Hierzu wurde der Einfluss der Kombinationsvakzine auf die zelluläre und humorale Immunantwort sowie die lokalen Reaktionen in der Lunge untersucht.

In weiteren Versuchen wurde die antigenspezifische Vakzinierung in Kombination mit IDO, IL-10 oder TGF- $\beta$  prophylaktisch sowie therapeutisch in einem Mausmodell der allergischen Atemwegsinflammation untersucht. Hierzu wurden die Mäuse nach (protektiv) oder vor (therapeutisch) der DNA-Immunisierung mit dem  $\beta$ Gal-Protein subkutan sensibilisiert. Daraufhin wurde der Einfluss der DNA-Vakzinierung auf die durch die Proteinsensibilisierung ausgelösten zellulären und humoralen Immunreaktionen, die Entwicklung einer Atemwegshyperreaktivität und die immunologischen Reaktionen in den Atemwegen untersucht. In diesem Modell sollte außerdem überprüft werden, ob es durch die DNA-Immunisierung zu einer Induktion regulatorischer T Zellen kommt, welche einen inhibitorischen Effekt auf die durch die Sensibilisierung induzierten Zellen ausüben.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Geräte**

| <b>Gerät</b>              | <b>Modell</b>                               | <b>Hersteller</b>                                 |
|---------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Analysenwaage             | Precisa 120 A                               | Otto Mild Waagen,<br>Karlsruhe                    |
| Autoklav                  | V-150                                       | Systec GmbH, Wettenberg                           |
| Bakterienschüttler        | RBI-112 Benchtop<br>Incubator ShakeÁerotron | Infors, Bottmingen, Schweiz                       |
| Bestrahlungsgerät         | Gammacell 2000                              | Mølsgaard Medical, Risø,<br>Dänemark              |
| Brutschrank               | CB 150, CB 210                              | Binder, Tutlingen                                 |
|                           | Heraeus KB 600                              | Heraeus, Hanau                                    |
| Chemilumineszenzdetektor  | ChemiLux ®, Göttingen                       | Intas®, Göttingen                                 |
| Digitalwaage              | Basic Typ 1202                              | Sartorius, München                                |
| Dispenser                 | Multipette® 4780                            | Eppendorf, Hamburg                                |
| Durchflusszytometer       | FACScan                                     | BD, Heidelberg                                    |
| Elektrophoresekammer      | VARIA 1                                     | Roth, Karlsruhe                                   |
| Elektroporator            | Gene Pulser™                                | BioRad, München                                   |
| ELISA-Washer              | Ultrawash plus                              | Dynex, Chantilly, USA                             |
| ELISpot- Auswerteeinheit  | ELISpot Lesesystem AID                      | AID (Autoimmun<br>Diagnostika GmbH),<br>Stassberg |
| Fluoreszenzmikroskop      | Olympus IX70                                | Olympus, Hamburg                                  |
| Folien-Einschweiß-Gerät   | Heat Sealer 1295-012                        | Audion Elektro, Kleve                             |
| Gel-Dokumentations-System | Fusion-SL-4.2 MP                            | PeqLab, Erlangen                                  |

| <b>Gerät</b>        | <b>Modell</b>                                                                                                                                | <b>Hersteller</b>                         |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Gen-Pistolen System | Helios™ Gene Gun, Modell 297BR0078: Cartridge-Kit (Nr. 165-2440).<br>Präparierstation (Nr 165-2418),<br>Patronenschneidegerät (Nr. 165.2422) | Bio-Rad, München                          |
| Gewebe-Dissoziator  | GentleMacs™ Dissociator                                                                                                                      | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach   |
| Heizblock           | Thermomixer 5436                                                                                                                             | Eppendorf, Hamburg                        |
| Lichtmikroskope     | Mikroskop CK2                                                                                                                                | Olympus, Hamburg                          |
|                     | Mikroskop CH2                                                                                                                                |                                           |
| Magnetrührer        | IKAMAG® REO                                                                                                                                  | Janke & Kunkel, Staufen                   |
| Mehrkanalpipette    | Finnpipette, 8-Kanalpipette, 30 - 300 µl                                                                                                     | Thermo Scientific, Waltham, United States |
|                     | Finnpipette, 12-Kanalpipette, 50 - 300 µl                                                                                                    | Labsystems, Helsinki, Finnland            |
| Mikrowelle          | EM-120S                                                                                                                                      | Sanyo, San Diego, USA                     |
| pH-Meter            | CG 840 mit Einstabmesskette N2042                                                                                                            | Schott, Hofheim am Taunus                 |
| Photometer          | Ultrospec 1100 pro                                                                                                                           | Pharmacia Biotech, Freiburg               |
| Pipetten            | Eppendorf-Reference®-Pipetten:<br>1 - 10 µl, 10 - 100 µl, 200 - 1000 µl                                                                      | Eppendorf, Hamburg                        |
|                     | Finpipette-Digital:<br>0,5 bis 10 µl, 40 bis 200 µl, 100 bis 1000µl                                                                          | Labsystems, Helsinki, Finnland            |
| Pipettierhilfe      | Pipetus® -akku                                                                                                                               | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt         |
|                     | Pipetboy plus                                                                                                                                | Tecnomara, Zürich, Schweiz                |

| <b>Gerät</b>                  | <b>Modell</b>                                             | <b>Hersteller</b>                                  |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Plethysmograph                | PLY 3211 (whole body)                                     | Buxco Electronics Inc,<br>Wilmington, USA          |
| Präparierbesteck              | –                                                         | Hammacher, Solingen                                |
| Präzisions Mikroplatten Leser | –                                                         | MWG Biotech, Ebersberg                             |
| Reagenzglasschüttler          | Vortex Genie 2™                                           | Bender & Hobein AG,<br>Zürich, Schweiz             |
| Schüttelinkubator             | RBI-112 Benchtop<br>Incubator Shaker Áerotron             | Infors AG, Bottmingen,<br>Schweiz                  |
| MACS® Seperator               | MACS® Multi Stand                                         | Miltenyi Biotec,<br>Bergisch Gladbach              |
| MACS® Magnet                  | OctoMACS                                                  | Miltenyi Biotec,<br>Bergisch Gladbach              |
| Spannungsgerät                | Electrophoresis constant<br>power supply ECPS<br>3000/150 | Pharmacia Biotech, Freiburg                        |
| Sterilwerkbank                | Heraeus Lamin Air® HB<br>2448                             | Heraeus, Hanau                                     |
| Stickstofftank                | BT 40                                                     | L'air liquid, Wiesbaden                            |
| Szintillationszähler          | 1205 Betaplate                                            | LKB Wallac, Freiburg                               |
| Thermocycler                  | 7900 HT Fast Real-Time<br>PCR System                      | Applied Biosystems,<br>Darmstadt                   |
|                               | DNA Thermocycler 480                                      | PerkinElmer, Zaventem,<br>Belgien                  |
| Ultraschallbad                | Transsonic T570                                           | Elma, Singen                                       |
| UV-Tisch                      | N90 MV 312 NM                                             | Faust, Schaffhausen,<br>Schweiz                    |
| Wasserbad                     | GFL Typ 1012                                              | Gesellschaft für<br>Labortechnik mbH,<br>Burgwedel |
| Wasserdeionisierungsanlage    | Purelab Classic DI                                        | ELGA, Bucks,<br>Großbritannien                     |

| <b>Gerät</b>        | <b>Modell</b>                            | <b>Hersteller</b>                         |
|---------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Zählhilfe           | Laboratory Counter                       | Becton Dickinson GmbH,<br>Heidelberg      |
| Zählkammer          | Neubauer Improved Bright<br>Line; 0,1 mm | AO, Buffalo, USA                          |
| Zellerntegerät      | 1295-001 Cell Harvester                  | LKB Wallac, Freiburg                      |
| Zentrifuge          | Sorvall RT 6000D<br>Biofuge              | Du Pont, Bad Homburg<br>Heraus, Wiesbaden |
|                     | Multifuge 1 L-R                          | Heraeus, Hanau                            |
|                     | Biofuge A                                | Heraeus, Wiesbaden                        |
| Zytospin-Zentrifuge | Cytospin 3                               | Shandon, Frankfurt                        |

### 2.1.2 Materialien

| <b>Material</b>                                 | <b>Modell</b>                      | <b>Hersteller</b>                                 |
|-------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Abdeckfolie für Realtime<br>PCR                 | –                                  | Abgene, England                                   |
| Abdeckfolie für ELISA                           | EASY seal™                         | Greiner-Bio-one,<br>Frickenhausen                 |
| Alufolie                                        | 30u-Qualität                       | Roth, Karlsruhe                                   |
| Bakteriologische Petrischalen                   | Ø 94 mm, Höhe 16 mm<br>(no.633161) | Greiner-Bio-one,<br>Frickenhausen                 |
| Braunüle                                        | 1,3 x 45 mm Vasofix®               | B/Braun, Melsungen                                |
| Deckgläser                                      | 18 x 18 mm                         | Vertrieb durch Diagonal<br>GmbH 6 Co. KG, Münster |
| Dispensiergerät-Aufsatz                         | PD-Tips 2,5 ml und 5 ml            | Brand GmbH & Co. KG,<br>Wertheim/Main             |
| Einmal-<br>Feindosierungsspritze,<br>zweiteilig | Injekt-F 1 ml<br>0,01 ml/1,0 ml    | B/Braun, Melsungen                                |

| <b>Material</b>               | <b>Modell</b>                                        | <b>Hersteller</b>                          |
|-------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
|                               | Omnifix <sup>®</sup> -F 1ml<br>0,01 ml/ 1,0 ml       |                                            |
| Einmalkanülen                 | 0,4 x 12 mm Sterican <sup>®</sup>                    | B/Braun, Melsungen                         |
|                               | 0,5 x 12 mm Sterican <sup>®</sup>                    |                                            |
|                               | 0,7 x 30 mm                                          | Becton Dickinson GmbH,<br>Heidelberg       |
| Einmalspritzen                | Ecoject <sup>®</sup> 10 ml                           | Dispomed Witt OHG,<br>Gelnhausen           |
|                               | 20 ml                                                | TERUMO <sup>®</sup> SYRINGE,<br>Belgien    |
| Einfrierbox                   | Cryo 1 Freezing container                            | Thermo Fisher Scientific,<br>Langenselbold |
| Einfrierröhrchen              | Nunc cryo Tube <sup>™</sup> vials                    | Nunc, Roskilde, Dänemark,                  |
| Einschweißfolien              | 102 x 258 mm                                         | Wallac, Turku, Finnland                    |
| Elektroporationsküvette       |                                                      | PeqLab, Erlangen                           |
| ELISA-Platten                 | 96-Loch-Flachbodenplatten,<br>Microlon, high binding | Greiner-bio-one GmbH,<br>Frickenhausen     |
| ELISpot-Platten               | Multiscreen 96-<br>Vertiefungsplatte                 | Millipore Corporation, USA                 |
| FACS-Röhrchen                 | Falcon 5 ml<br>Rundbodenröhrchen                     | Becton Dickinson GmbH,<br>Heidelberg       |
| gentleMacs <sup>™</sup> Tubes | C Tubes                                              | Miltenyi Biotec GmbH,<br>Bergisch Gladbach |
| Gewebekulturschalen           | Cellstar:<br>Ø 100 mm, Höhe 20 mm                    | Greiner Bio-one,<br>Frickenhausen          |
| Glasfaserfilter               | 102 x 258 mm                                         | Wallac Turku, Finnland                     |
| Glaspipetten                  | Precicolor: 5 ml, 10 ml und<br>25 ml                 | HBG (Henneberg-Sander<br>GmbH), Giessen    |
| Handschuhe                    | Sempercure <sup>®</sup>                              | Semperit, Österreich                       |
| Kulturflaschen                | 25 cm <sup>2</sup>                                   | Greiner Bio-One GmbH,<br>Frickenhausen     |
|                               | 75 cm <sup>2</sup>                                   |                                            |
|                               | 175 cm <sup>2</sup>                                  |                                            |

| <b>Material</b>                     | <b>Modell</b>                                       | <b>Hersteller</b>                        |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Kulturplatten                       | Cellstar Gewebe-Kultur Platte, 96-Loch (Flachboden) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen      |
|                                     | Cellstar Gewebe-Kultur Platte, 96-Loch (Rundboden)  |                                          |
|                                     | Cellstar Gewebe-Kultur Platte, 6-Loch (Flachboden)  |                                          |
|                                     | Cellstar Gewebe-Kultur Platte, 24-Loch (Flachboden) |                                          |
|                                     | Cellstar Gewebe-Kultur Platte, 48-Loch (Flachboden) |                                          |
| Küvetten                            | Einmal-Küvetten, 1,5 ml                             | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim            |
| Macs <sup>®</sup> Separationssäulen | 25 MS Columns                                       | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach  |
| Matrandobjektträger                 | 76 x 26 mm                                          | Diagonal GmbH & Co. KG, Münster          |
| Nitrozellulosemembran               | Hybond <sup>TM</sup> -ECL <sup>TM</sup>             | Amersham Bioscience, Braunschweig        |
| Parafilm                            | Parafilm N                                          | Nationalcan <sup>TM</sup> , Chicago, USA |
| Pasteurpipetten                     | 150 mm                                              | VWR GmbH, Darmstadt                      |
| Pipettenspitzen                     | Kristallspitzen: Tip one 0,1 bis 10 µl              | STARLAB GmbH, Ahrensburg                 |
|                                     | Weißer Spitzen: bis 200 µl                          | Roth, Karlsruhe                          |
|                                     | Gelbe Spitzen: bis 200 µl                           | Sarstedt, Nümbrecht                      |
|                                     | Blaue Spitzen: bis 1000 µl                          | Roth, Karlsruhe                          |
| Plastikpipetten                     | 5 ml, 10 ml, 25 ml                                  | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen      |
| Polypropylen-Röhrchen               | 15 ml und 50ml (Spitzboden)<br>12 ml (Rundboden)    | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen      |
| Reaktionsgefäße                     | 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml                             | Sarstedt AG, Nümbrecht                   |
| Röntgenfilm                         | CL-XPosure                                          | Pierce, Rockford, USA                    |

| <b>Material</b>                    | <b>Modell</b>                                | <b>Hersteller</b>                     |
|------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------|
| Schlauch für Gen-Pistolen-Patronen | Tefzel Tubing                                | Bio Rad, München                      |
| Sicherheitsreaktionsgefäße         | 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml                         | Eppendorf, Hamburg                    |
| Spritzenvorsatzfilter              | 0,2 µm Celluloseacetat                       | Schleicher & Schuell GmbH,<br>Dassel  |
|                                    | 0,45 µm Celluloseacetat                      |                                       |
| Sterilfilter                       | 0,45 µm Bottle Top                           | Sarstedt AG, Nümbrecht                |
|                                    | 0,2 µm Bottle Top                            |                                       |
| Thermo-96-Loch-Platten             | 96-Loch-Mikrotestplatte,<br>Thermowell® GOLD | Corning Incorporated,<br>Corning, USA |
| Zellsieb                           | Cell Strainer Ø 40 µm                        | Becton Dickinson GmbH,<br>Heidelberg  |
| Zellschaber                        | 24 cm                                        | Renner GmbH,<br>Dannstadt             |

### 2.1.3 Chemikalien

| <b>Substanz</b>                                                              | <b>Hersteller</b>                    |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 2,2,2 Tribromethanol                                                         | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| 2-Methyl-2-butanol                                                           | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| 2-β-Mercaptoethanol                                                          | Roth, Karlsruhe                      |
| 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), Tabletten                                     | Sigma, Deisenhofen                   |
| Absolute SYBR Green Rox Mix                                                  | Thermo Fisher Scientific, Bonn       |
| AEC                                                                          | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Agar-Agar, Kobe I                                                            | Roth, Karlsruhe                      |
| Agarose                                                                      | Herolab, Wiesloch                    |
| Alkopharm 70 (70%iger Alkohol) zur Desinfektion                              | Brüggemann, Heilbronn                |
| Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)                                         | Roth, Karlsruhe                      |
| Ammoniumsulfat                                                               | Roth, Karlsruhe                      |
| Ampicillin (C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S) | Ratiopharm, Ulm                      |
| Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )                                   | Roth, Karlsruhe                      |



| Substanz                                                                         | Hersteller                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Bovines Serum Albumin (BSA)                                                      | PAA Laboratories, Cölbe                                   |
| Bromphenolblau, Na-Salz (C <sub>19</sub> H <sub>37</sub> BrNa)                   | Roth, Karlsruhe                                           |
| Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )                                              | Roth, Karlsruhe                                           |
| Dextrose                                                                         | Roth, Karlsruhe                                           |
| Diff-Quick Färbeset                                                              | Diff Quick® Medion Diagnostics GmbH,<br>Düdingen, Schweiz |
| Dimethylformamid (DMF)                                                           | Sigma, Deisenhofen                                        |
| DMSO (Dimethylsulfoxid)                                                          | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim                      |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )                    | Roth, Karlsruhe                                           |
| dNTP-Mix (Desoxynukleosidtriphosphat)                                            | Roche, Mannheim                                           |
| D(+)-Saccharose (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )               | Roth, Karlsruhe                                           |
| DTT (Dithiothreitol) (1 M in H <sub>2</sub> O)                                   | Sigma, Steinheim                                          |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)                                              | Roth, Karlsruhe                                           |
| EGTA (Ethylenglykoltetraessigsäure)                                              | Roth, Karlsruhe                                           |
| Entellan®                                                                        | Merck KGaA, Darmstadt                                     |
| Essigsäure 100%ig (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OH)                             | Roth, Karlsruhe                                           |
| Ethanol 96%ig (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH) vergällt                        | Martin und Werner Mundo OHG, Mainz-Kostheim               |
| Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridiumbromid) 1% (w/v) Lösung | Roth, Karlsruhe                                           |
| FugeneHD                                                                         | Roche, Mannheim                                           |
| Glukose                                                                          | Sigma, St. Louis                                          |
| Glycerin                                                                         | Roth, Karlsruhe                                           |
| Glyzin                                                                           | Roth, Karlsruhe                                           |
| Gold-Trägerpartikel (1,6 µm)                                                     | BioRad, München                                           |
| Harnstoff (CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )                       | Roth, Karlsruhe                                           |
| Hefe-Extrakt                                                                     | Gibco BRL, Erlangen                                       |
| HEPES (N-(-2Hydroxyethyl)-piperazin-N-2-ethansulfonsäure)                        | Roth, Karlsruhe                                           |
| Isopropanol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O)                                    | Heidinger, Stuttgart                                      |
| Kaliumchlorid (KCl)                                                              | Merck, Darmstadt                                          |

| Substanz                                                                                               | Hersteller                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ )                                                             | Roth, Karlsruhe                                |
| Kanamycinsulfat ( $\text{C}_{18}\text{H}_{236}\text{N}_4\text{O}_{11} \times \text{H}_2\text{SO}_4$ )  | Boehringer, Mannheim                           |
| Ketamin (500mg/10 ml)                                                                                  | Ratiopharm GmbH, Ulm                           |
| Kollagenase Typ 2                                                                                      | Worthington, St. Katharinen                    |
| L(+)-Glutamin ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ )                                        | Roth, Karlsruhe                                |
| Lipopolysaccharid (LPS), von <i>E. coli</i>                                                            | Sigma-Aldrich, Steinheim                       |
| L-Kynurenine                                                                                           | Sigma, Deisenhofen                             |
| Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )                                                                   | Merck, Darmstadt                               |
| Methanol                                                                                               | Roth, Karlsruhe                                |
| $\text{MnCl}_2$                                                                                        | Merck, Darmstadt                               |
| MOPS                                                                                                   | Roth, Karlsruhe                                |
| Natrium-Acetat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{H}_2\text{O}$ )                               | Roth, Karlsruhe                                |
| Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )                                                                         | Roth, Karlsruhe                                |
| Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )                                                                       | Roth, Karlsruhe                                |
| Natriumcitrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ )                                          | Roth, Karlsruhe                                |
| Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )                                                           | Roth, Karlsruhe                                |
| Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat<br>( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )          | Roth, Karlsruhe                                |
| Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )                                                                      | Roth, Karlsruhe                                |
| Natriumpyruvat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )                                                           | SERVA Feinbiochemica GmbH & Co.,<br>Heidelberg |
| Ortho-Phenylendiamin-Dihydrochloride<br>(OPD) ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2 \times 2 \text{HCl}$ ) | Sigma, Deisenhofen                             |
| Paraformaldehyd (PFA)                                                                                  | Merck, Darmstadt                               |
| Penicillin/Streptomycin $10^4$ I-U/ml/ $10^4$<br>$\mu\text{g/ml}$                                      | PAA, Pasching, Österreich                      |
| Pentobarbital                                                                                          | Merial GmbH, Rohrdorf                          |
| Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol                                                                       | AppliChem, Darmstadt                           |
| Polyvinylpyrrolidon-Ethanol-Lösung (PVP)                                                               | BioRad, München                                |
| Rinderserumalbumin                                                                                     | Sigma-Aldrich, Steinheim                       |
| RNase freie DNase (1500 U)                                                                             | Qiagen, Hilden                                 |
| RNase freies $\text{H}_2\text{O}$                                                                      | Qiagen, Hilden                                 |

| <b>Substanz</b>                                                                                                 | <b>Hersteller</b>            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Rompun 2%                                                                                                       | Bayer Healthcare, Leverkusen |
| Roti-Quant®                                                                                                     | Roth, Karlsruhe              |
| Salzsäure (HCl) 37%ig                                                                                           | Roth, Karlsruhe              |
| Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) 95 Vol%ig                                                       | Roth, Karlsruhe              |
| SDS (Sodiumdodecylsulfat)                                                                                       | Roth, Karlsruhe              |
| Spermidin                                                                                                       | Sigma, Deisenhofen           |
| T4-DNA-Ligasepuffer (5x)                                                                                        | Fermentas, St. Leon Roth     |
| TEMED (N,N,N',N'-<br>Tetramethylethylendiamin)                                                                  | Sigma, Deisenhofen           |
| Trichloressigsäure                                                                                              | Roth, Karlsruhe              |
| Tri-Natriumcitrat-Dihydrat(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> a <sub>3</sub> O <sub>7</sub> x 2<br>H <sub>2</sub> O) | Roth, Karlsruhe              |
| Tris (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )                                                          | Roth, Karlsruhe              |
| Tris/HCl (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> HCl)                                                   | Roth, Karlsruhe              |
| TritonX-100<br>Octylphenoxypolyethoxyethanol, C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>11</sub> )                 | Sigma, Deisenhofen           |
| Trypanblau                                                                                                      | Sigma-Aldrich, Steinheim     |
| Trypton                                                                                                         | Roth, Karsruhe               |
| Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-<br>Monolaurat)                                                                | Sigma-Aldrich, Deisenhofen   |
| Wasser, pyrogenfrei, steril                                                                                     | Braun, Melsungen             |
| Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30%ig                                                       | Merck KGaA, Darmstadt        |
| 1-Methy-D-Tryptophan (C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )                           | Sigma-Aldrich, Deisenhofen   |

## 2.1.4 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

### 2.1.4.1 Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben wurden die Puffer und Lösungen bei 4°C gelagert.

#### **AEC-Lösung**

##### Stammlösung:

1 AEC-Tablette

gelöst in 2,5 ml DMF

##### Gebrauchslösung:

525 µl Stammlösung

10 ml 0,1 M Na-Acetatpuffer (pH 5)

30 min rühren mittels Magnetrührer

filtrieren (0,45 µm)

kurz vor der Färbereaktion Zugabe von 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ml AEC-Lösung

#### **Bromphenolblaulösung:**

42 g Harnstoff

50 g D(+)-Saccharose

0,0037 g Na<sub>2</sub>EDTA

0,1 g Bromphenolblau

gelöst in 100 ml aqua dest.

#### **Gey's Lyse Puffer:**

10 mM KHCO<sub>3</sub>

155 mM Ammoniumchlorid

100µM EDTA

gelöst in aqua dest.

auf pH 7,5 einstellen

steril filtrieren (0,2 µm)

**1 x PBS (Phosphat Buffered Saline):**

40,2 g NaCl

7,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

gelöst in 5 l aqua dest.

mit 10 M NaOH auf pH 7,2 einstellen und autoklavieren.

**10 x PBS (Phosphat Buffered Saline):**

402 g NaCl

78 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

gelöst in 5 l aqua dest.

mit 10 M NaOH auf pH 6,6 einstellen und autoklavieren

**HEPES-Puffer**

10 mM HEPES

150 mM NaCl

5 mM KCl

1mM  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

1,8 mM  $\text{CaCl} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

gelöst in aqua dest.

auf pH 7,4 einstellen mit 10N NaOH

steril filtrieren (0,2  $\mu\text{m}$ )

**MACS-Puffer:**

1 x PBS/2mM EDTA

2% (v/v) FCS steril filtriert (0,2  $\mu\text{m}$ )

**50xTAE (Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure):**

2 M Tris

5,7% (v/v) Essigsäure (100%)

0,05 M EDTA

gelöst in aqua dest.

### **Trypanblau-Lösung:**

Stammlösung:

0,01% (w/v) Trypanblau,

0,001% (w/v) Na-Azid,

gelöst in aqua dest.

Stammlösung im Verhältnis 1:10 mit 10 x PBS verdünnen und bei 4°C lagern.

### **6x DNA-Gelladepuffer:**

0,25% (w/v) Bromphenolblau

0,25% (w/v) Xylencyanol

40% (v/v) 30% Glycerin

gelöst in aqua dest.

## **2.1.4.2 Lösungen für die Anästhesie**

### **Avertin**

Avertin-Stammlösung:

10 g 2,2,2-Tribromethanol

gelöst in 10 ml tertiärem Amylalkohol

Lichtgeschützt lagern

Avertin-Gebrauchslösung:

2,5%ig aus Stammlösung

250 µl Stammlösung

in 9,75 ml 1 x PBS (pH 7,2) (RT) gelöst

Lichtgeschützt lagern

### **Pentobarbital-Gebrauchslösung:**

Letale Dosis/Maus

40 µl Pentobarbital

160 µl 1 x PBS

200 µl intraperitoneal verabreicht

**Rompun/Ketamin:**

Letale Dosis/Maus

0,8 ml 2% Rompun

2 ml 50 mg/ml Ketamin

1 ml 1 x PBS

200µl intraperitoneal verabreicht

**2.1.4.3 Lösungen für die FACS-Analyse**

**FACS-Medium:**

2% (v/v) FCS (PAN Biotech)

filtriert (0,45 µM)

in 1 x PBS verdünnt

**Fixierlösung für FACS-Analyse (0,7% PFA):**

0,7 g Paraformaldehyd (PFA)

gelöst in 100 ml 1 x PBS (pH 7,2)

zum Lösen auf 56°C erwärmen

**Puffer für intrazelluläre FACS-Färbung:**

0,5 % (v/v) FCS (PAN Biotech)

steril filtriert 0,2 µm und

in 1 x PBS / 2 mM EDTA verdünnt.

**Permeabilisierungspuffer:**

(FoxP3 Staining Buffer Set, Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)

10 x Permeabilisierungspuffer

1:10 in aqua dest. verdünnt

**Fix-Perm-Lösung:**

(FoxP3 Staining Buffer Set, Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)

ein Teil Lösung 1

drei Teile Lösung 2

#### **2.1.4.4 Puffer und Lösungen für ELISA**

##### **Beschichtungspuffer für ELISA:**

0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-Puffer

8,041 g NaHCO<sub>3</sub>

gelöst in 1 Liter aqua dest.

pH-Wert: 8,2

##### **Blockierungs- und Verdünnungspuffer für ELISA:**

PBS/ 1%BSA

1 g BSA

gelöst in 100 ml 1 x PBS.

##### **OPD (Orthonitrophenoldiamin) Substratpuffer:**

0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

0,1 M Na-Citrat x H<sub>2</sub>O

gelöst in aqua dest.

1 mg OPD pro ml Substratpuffer

1 µl/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

##### **Stopplösung für ELISA:**

1 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

in aqua dest

##### **Waschpuffer für Mikrotiterplatten:**

1 x PBS ( pH 7,2)

0,1% (v/v) Tween 20

#### **2.1.4.5 Lösungen für die Herstellung von Gen-Pistolen-Patronen**

##### **1 M CaCl<sub>2</sub>:**

147,02 g CaCl<sub>2</sub>

gelöst in 1 l aqua dest.



**Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Ethanol-Lösung**

Stammlösung:

20 mg PVP/ml in Ethanol absolut

Gebrauchslösung:

0,075 mg/ml in Ethanol absolut

frisch ansetzen

**Spermidin-Lösung (0,05 M):**

7,26 mg/ml Spermidin

gelöst in endotoxinfreiem aqua dest.

**2.1.4.6 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze**

**Glutamin:**

200 mM Stammlösung:

5,84 g L(+)-Glutamin

gelöst in 200 ml 1 x PBS

steril filtrieren (0,2 µm)

**Natriumpyruvat:**

100 mM Natriumpyruvat in 1 x PBS

**Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep):**

10<sup>4</sup> I.U./ml Penicillin

10<sup>4</sup> µg/ml Streptomycin

**2-β-Mercaptoethanol:**

5 mM Stammösung:

40 µl β-Mercaptoethanol in

114 ml RPMI oder IMDM

steril filtrieren (0,2 µm)

**Lungen-Aufbewahrungsmedium:**

EMEM (Eagle´s Minimum Essentiell Medium, Bio Whittaker/Cambrex)

1% (v/v) Pen/Strep-Stammlösung

**Waschmedium für die Zellkultur:**

EMEM (Eagle´s Minimum Essentiell Medium, Bio Whittaker/Cambrex)

2% (v/v) FCS (PAN-Biotech)

1% (v/v) Pen/Strep-Stammlösung

**Kulturmedium zum Nachweis von Tryptophan und Kynureninen**

tryptophanfreies RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen)

10% (v/v) FCS (PAA Laboratories)

1% (v/v) L-Glutamin-Stammlösung

1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol-Stammlösung

1% (v/v) Pen/Strep-Stammlösung

20 mM Tryptophan (Sigma-Aldrich)

**Kulturmedium für 3T3-Zellen**

IMDM (Iscoe´s Modified Dulbecco´s Media, Gibco/Invitrogen)

10% (v/v) FCS (PAA Laboratories)

1% (v/v) L-Glutamin-Stammlösung

1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol-Stammlösung

1% (v/v) Pen/Strep-Stammlösung

1% (v/v) Natriumpyruvat

**Kulturmedium für Lungen-, Milz- und Lymphknotenzellen**

IMDM (Iscoe´s Modified Dulbecco´s Media, Gibco/Invitrogen)

10% (v/v) FCS (PAA Laboratories)

1% (v/v) L-Glutamin-Stammlösung

1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol-Stammlösung

1% (v/v) Pen/Strep-Stammlösung

**Einfriermedium**

FCS (PAA Laboratories)

10% (v/v) DMSO

**2.1.4.7 Nährmedien und Nährböden für die Bakterienkultur****LB (Luria Bertani)-Medium**

10 g Trypton

5g Hefeextrakt

10 g NaCl

gelöst in 1 l aqua. dest

pH-Wert auf 7,2 -7,4 einstellen und anschließend autoklavieren.

Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin als Selektionsmarker

oder Zugabe von 100 µg/ml Kanamycin als Selektionsmarker

**B (Luria Bertani)-Agar**

15 g Agar-Agar

gelöst in 1 l LB-Medium

autoklaviert und nach Abkühlen auf 65°C in Petrischalen gegossen.

Aufbewahrung der LB-Agarplatten bei 4°C mit der Agar-Seite nach oben

**2.1.5 Längenstandards**

| <b>Längenstandard</b>                                                                 | <b>Hersteller</b>        |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Molekulargewichtsmarker (GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder Plus, 0,5 mg DNA/ml, 250-10000 Bp) | Fermentas, St. Leon Roth |

**2.1.6 Bakterienstamm**

*Escherichia coli* TOP10

Genotyp: McrA  $\Delta$  (mrr-hsd RMS-mcrBC)  $\phi$  80 lac Z  $\Delta$  M 15  $\Delta$  lac X 74 deo R rec A I ara B 139  $\Delta$  (ara-lac) 7697 gal U gal K rpsI (strR) end AI nup G

### 2.1.7 Enzyme

| Enzym                                          | Hersteller                  |
|------------------------------------------------|-----------------------------|
| CIAP                                           | Fermentas, St. Leon Roth    |
| DNase I (10 mg/ml)                             | Roche, Mannheim             |
| “Extravidin”, Streptavidin-Peroxidase Konjugat | Sigma-Aldrich, Steinheim    |
| Kollagenase Typ 2 (50 mg/ml)                   | Worthington, St. Katharinen |
| Restriktionsendonukleasen                      | Fermentas, St. Leon Roth    |
| T4-DNA-Ligase                                  | Fermentas, St. Leon Roth    |

### 2.1.8 Fertigsysteme

| Fertigsystem                            | Hersteller                                        |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Big Dye Terminator Sequencing Kit       | Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA |
| Endofree <sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit  | Qiagen, Hilden                                    |
| Endofree <sup>®</sup> Plasmid Midi Kit  | Qiagen, Hilden                                    |
| iScript <sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit | Bio-Rad, München                                  |
| Plasmid Maxi Kit                        | Qiagen, Hilden                                    |
| Plasmid Midi Kit                        | Qiagen, Hilden                                    |
| Plasmid Mini Kit                        | Qiagen, Hilden                                    |
| QIAquick Gel Extraction Kit             | Qiagen, Hilden                                    |
| QIAshredder <sup>™</sup>                | Qiagen, Hilden                                    |
| Rneasy <sup>®</sup> Plus Mini Kit       | Qiagen, Hilden                                    |

## 2.1.9 Primer

### 2.1.9.1 Primer für die Realtime-PCR

| Murines Zielgen | Primersequenz                                                                      |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| FoxP3           | Sense: 5'-CTCATCCGATGGGCCATCCTGGAA-3'<br>Antisense: 5'-TTCCAGGTGGCGGGGTGGTTTCTG-3' |
| GAPDH           | Sense: .....5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3'<br>Antisense: 5'-TTTCTCGTGGTTCACACCC-3'     |
| IDO             | Sense: 5'-AAGGGCTTCTTCCTCGTCTC-3'<br>Antisense: 5'-AAAAACGTGTCTGGGTCCAC-3'         |
| IL-10           | Sense:.....5'-CCAAGCCTTATCGGAAATGA-3'<br>Antisense: 5'-TTTTCACAGGGGAGAAATCG-3'     |
| TGFβ1           | Sense: 5'-TTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3'<br>Antisense: 5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGGC-3'         |

## 2.1.10 Plasmide

| System | Hersteller        |
|--------|-------------------|
| pCi    | Promega, Mannheim |

## 2.1.11 Antikörper

### 2.1.11.1 Antikörper für die Absättigung der FCγRII/III-Rezeptoren

Zur Absättigung freier FC-Rezeptoren wurde der Antikörper 2.4G2 verwendet, bei dem es sich um einen Ratte-anti-Maus FCγRII/III (CD16/32) Antikörper vom Isotyp Ratte-IgG2b handelt (Unkless, 1997). Dieser wurde aus dem Kulturüberstand des B-Zell-Hybridoms 2.4G2 gewonnen und 1:100 verdünnt in FACS-Medium eingesetzt (0,25 µg/Probe).

### 2.1.11.2 Antikörper für die FACS-Analyse

| Antikörper | Isotyp              | Klon     | Markierung | Verdünnung | Hersteller                                     |
|------------|---------------------|----------|------------|------------|------------------------------------------------|
| anti-CD3   | Hamster<br>IgG      | 145-2c11 | Cy5PE      | 1:50       | eBioscience, San<br>Diego, USA                 |
| anti-CD4   | Ratte IgG2a         | RM4-5    | Cy5PE      | 1:50       | BD Biosciences<br>Pharmingen,<br>Heidelberg    |
| anti-CD4   | Ratte IgG2b         | GK1.5    | FITC       | 1:25       | Miltenyi Biotec<br>GmbH, Bergisch,<br>Gladbach |
| anti-CD8   | Ratte IgG2a         | 53-6.7   | Cy5PE      | 1:50       | BD Biosciences<br>Pharmingen,<br>Heidelberg    |
| anti-CD8   | Ratte IgG2a         | 53.-6.7  | PE         | 1:25       | Miltenyi Biotec<br>GmbH, Bergisch<br>Gladbach  |
| anti-CD25  | Ratte-IgM $\lambda$ | 7D4      | FITC       | 1:50       | BD Biosciences,<br>Heidelberg                  |
| anti-FoxP3 | Maus IgG1           | 3G3      | PE         | 1:10       | Miltenyi Biotec<br>GmbH, Bergisch<br>gladbach  |

### 2.1.11.3 Isotypenkontrollantikörper

| Antikörper  | Klon   | Markierung | Verdünnung | Hersteller                                  |
|-------------|--------|------------|------------|---------------------------------------------|
| Ratte-IgG2a | R35-95 | FITC       | 1:100      | BD Biosciences<br>Pharmingen,<br>Heidelberg |
| Ratte-IgG2a | R35-95 | Cy5PE      | 1:100      | BD Biosciences<br>Pharmingen,<br>Heidelberg |

| Antikörper | Klon    | Markierung | Verdünnung | Hersteller                                  |
|------------|---------|------------|------------|---------------------------------------------|
| Ratte-IgG1 | R101    | FITC       | 1:100      | CALTAG                                      |
| Maus-IgG1  | MOPC-21 | FITC       | 1:5        | BD Biosciences<br>Pharmingen,<br>Heidelberg |

#### 2.1.11.4 Antikörper für Immunglobulin-ELISA

| Antikörper                                      | Klon/Artikelnummer | Konzentration/eingesetzte<br>Konzentration | Hersteller               |
|-------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------|--------------------------|
| Ziege-anti-Maus<br>IgG1, biotinyliert           | 1070-08            | 1 mg/ml<br>0,2 µg/ml in NaHCO <sub>3</sub> | Biozol, Eching           |
| Ziege-anti-Maus<br>IgG2a,<br>biotinyliert       | 1080-08            | 1 mg/ml<br>0,2 µg/ml in NaHCO <sub>3</sub> | Biozol, Eching           |
| Ratte-anti-Maus<br>IgE                          | EM95-3             | 1 mg/ml<br>1 µg/ml in NaHCO <sub>3</sub>   | BANIYASH &<br>ESHAR 1984 |
| Maus-anti-Ratte<br>IgG, F(ab')-<br>biotinyliert | 212-065-106        | 2,2 mg/ml<br>(2,2 mg/ml)                   | Dianova, Hamburg         |

#### 2.1.11.5 Antikörper für Zytokin-ELISA/IFN-γ-EliSpot

##### Capture Antikörper

| Antikörper                 | Isotyp     | Klon   | Konzentration/<br>eingesetzte<br>Konzentration | Hersteller                     |
|----------------------------|------------|--------|------------------------------------------------|--------------------------------|
| anti-Maus IFN-γ<br>(ELISA) | Ratte IgG1 | R4-6A2 | 1 mg/ml<br>2 µg/ml in<br>NaHCO <sub>3</sub>    | (Spitalny und<br>Havell, 1984) |

|                                      |                       |           |                                                    |                                             |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| anti-Maus IFN- $\gamma$<br>(EliSpot) | Ratte-IgG1            | R4-6A2    | 1 mg/ml<br>2 $\mu$ g/ml<br>In sterilem<br>1xPBS    | BD Biosciences<br>Pharmingen,<br>Heidelberg |
| anti-Maus IL-5                       | Ratte IgG2a           | 11B11     | 0,5 mg/ml<br>1 $\mu$ g/ml in<br>NaHCO <sub>3</sub> | BD Biosciences<br>Pharmingen,<br>Heidelberg |
| anti-Maus IL-10                      | Ratte IgG2b, $\kappa$ | JES5-16E3 | 0,5 mg/ml<br>1 $\mu$ g/ml in<br>1xPBS              | eBioscience, San<br>Diego, USA              |
| anti-rh TGF- $\beta$                 | Human-IgG1            | 341-BR    | 0,5 mg/ml<br>0,2 $\mu$ g/ml in 1x<br>PBS           | R&D Systems,<br>Wiesbaden                   |

#### Detektionsantikörper

| Antikörper                                 | Isotyp               | Klon        | Konzentration/<br>Verdünnung    | Hersteller                                  |
|--------------------------------------------|----------------------|-------------|---------------------------------|---------------------------------------------|
| anti-Maus IFN- $\gamma$<br>biotinyliert    | Ratte IgG1           | AN 18.17.24 | 1:5000                          | Cherwinski <i>et al.</i> , 1987             |
| anti-Maus IL-5<br>biotinyliert             | Ratte IgG2a          | TRFK4       | 0,5 mg/ml<br>1 $\mu$ g/ml       | BD Biosciences<br>Pharmingen,<br>Heidelberg |
| anti-Maus IL-10<br>biotinyliert            | Ratte IgG1, $\kappa$ | JES5-2A5    | 0,5 mg/ml<br>(0,5 $\mu$ g/ml)   | eBioscience, San<br>Diego, USA              |
| anti-human<br>TGF- $\beta$<br>biotinyliert | Huhn-IgY             | BAF240      | 50 $\mu$ g/ml<br>0,1 $\mu$ g/ml | R&D Systems,<br>Wiesbaden                   |

#### Als Standard im Zytokin-ELISA verwendete Zytokine

| Zytokin          | Artikelnummer | Startkonzentration | Hersteller                    |
|------------------|---------------|--------------------|-------------------------------|
| rm IFN- $\gamma$ | 19301T        | 5ng/ml             | BD Biosciences,<br>Heidelberg |



| Zytokin         | Artikelnummer | Startkonzentration | Hersteller                  |
|-----------------|---------------|--------------------|-----------------------------|
| rm IL-5         | 14-8051-62    | 2ng/ml             | eBioscience, San Diego, USA |
| rm IL-10        | 417-ML        | 4ng/ml             | R&D Systems, Wiesbaden      |
| rm TGF- $\beta$ | 240-B         | 10 ng/ml           | R&D Systems, Wiesbaden      |

### 2.1.12 MACS<sup>®</sup> MicroBeads (Miltenyi- Biotec)

| MACS <sup>®</sup> MicroBeads          | Aufreinigung von                             |
|---------------------------------------|----------------------------------------------|
| CD8 (Ly-2) Microbeads (# 130-049-401) | CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (Positivselektion) |
| CD4 (L3T4) Microbeads (# 130-049-201) | CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (Positivselektion) |

### 2.1.13 Peptide

| Peptid                                               | Hersteller         |
|------------------------------------------------------|--------------------|
| $\beta$ Galaktosidase <sub>876-884</sub> (TPHPARIGL) | Sigma, Deisenhofen |

### 2.1.14 Antigene

| Antigen                                | Hersteller         |
|----------------------------------------|--------------------|
| $\beta$ -Galaktosidase (# G-31539)     | Sigma, Deisenhofen |
| $\beta$ -Galaktosidase (# 10745731001) | Roche, Mannheim    |

### 2.1.15 Zytokine

#### Interleukin-2

Cetus, Emeryville, USA

### 2.1.16 Zelllinien

#### **NIH-3T3-Zellen:**

Bei den murinen NIH-3T3 Zellen handelt es sich um eine Fibroblastenzelllinie.

Es sind plastikadhärente Zellen, die sich effizient transfizieren lassen und aufgrund dessen in dieser Arbeit zur Funktionsanalyse hergestellter Expressionsplasmide verwendet wurden. Des Weiteren ist es möglich mit Hilfe dieser Zellen DNA-Konstrukte unter der Kontrolle des Fascin-Promotors zu testen, da diese Zellen den Fascin-Promotor exprimieren.

### 2.1.17 Mäuse

Für die Versuche wurden Inzuchtmäuse der Stämme BALB/cJ (Genotyp H-2<sup>d</sup>) ab einem Alter von 6 Wochen verwendet. Die Mäuse wurden in der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universität Mainz gezüchtet und unter pathogen freien Bedingungen gehalten.

## 2.2 Tierversuche

### 2.2.1 Immunisierungsmethoden

#### 2.2.1.1 DNA-Immunisierung mit der Genpistole

Die DNA-Immunisierung mit an Goldpartikel gekoppelter Plasmid-DNA ermöglicht eine direkte Transfektion von Zellen in der Haut und somit eine gezielte Genexpression. Bei der biolistischen Transfektion wurden die Goldpartikel mit der Plasmid-DNA durch Heliumdruck auf die rasierte Bauchhaut der Versuchstiere appliziert und somit die Zellen direkt transfiziert.

##### 2.2.1.1.1 Kopplung von Plasmid-DNA an Goldpartikel

Endotoxinfreie Plasmid-DNA wurde für die biolistische Transfektion an Goldpartikel eines Durchmessers von 1,6 µm gekoppelt.

Dazu wurden pro Patrone je 1 mg Gold und 2 µg je Plasmid-DNA benötigt. Die Goldmenge für die entsprechende Patronenanzahl wurde in ein pyrogenfreies 1,5 ml Reaktionsgefäß eingewogen und 100 µl 0,05 M Spermidin zugegeben, auf dem Reagenzglasschüttler gemischt und die Goldpartikel für 15 sec im Ultraschallbad vereinzelt. Die für die Patronenanzahl entsprechende DNA-Menge wurde hinzugegeben, die Suspension erneut gemischt und rasch 100 µl 1M CaCl<sub>2</sub> zugegeben und wieder gut durch Rütteln gemischt. Während einer zehnminütigen Inkubation bei RT präzipitierte die DNA an das Gold.

Das DNA-Gold-Gemisch wurde 5 sec bei 7000 g in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Gold-Sediment durch anschnicken aufgebrochen. Anschließend wurde das Sediment dreimal mit 1 ml 96%igem Ethanol gewaschen und dafür zwischendurch immer wieder abzentrifugiert.

Der Ethanol wurde nach dem letzten Waschen vollständig entfernt und das Gold/DNA Gemisch mit insgesamt 1,75 ml pro 30 Patronen in einer frisch angesetzten Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Lösung (0,075 mg/ml) in drei Schritten aufgenommen und in ein 15 ml Schraubdeckelröhrchen überführt.

Das Schraubdeckelröhrchen wurde mit Parafilm<sup>®</sup> abgedichtet und bis zur Herstellung der Patronen bei -20°C gelagert.

### **2.2.1.1.2 Herstellung von Patronen für die Genpistole**

Zur Herstellung von Patronen zur DNA-Immunisierung wurde die Gold-DNA-PVP-Suspension mit Hilfe einer 10 ml Spritze in einen zuvor 4 min mit Stickstoff getrockneten Plastikschauch (Tefzel Tubing, BioRad) aufgezogen. Der Schlauch mit dem Gold wurde in die Schiene einer Präparierstation („Tubing Prep Station“, Bio Rad) geschoben. Der Schlauch wurde für 4 min ruhen gelassen, damit sich die DNA-Gold-Komplexe absetzen konnten. Diese haften aufgrund des Klebstoffes PVP, der in dem Gemisch enthalten ist, an der Wand des Schlauches. Die überschüssige Ethanol-PVP-Lösung wurde mit einer 10 ml Spritze vorsichtig aus dem Schlauch abgezogen und der Schlauch anschließend 4 min durch eine Begasung mit Stickstoff getrocknet.

Der fertige Schlauch wurde aus der Präparierstation entnommen und mit einem Patronen-Schneidegerät (BioRad) in gleichgroße Patronen zerkleinert. Diese wurden bis zu ihrer Verwendung in einem mit Parafilm luftdicht verschlossenem 50 ml Schraubdeckelröhrchen bei 4°C aufbewahrt.

### **2.2.1.1.3 Durchführung der biolistischen Transfektion**

Zunächst wurde den Versuchstieren mit einem Langhaarschneider die Bauchhaut rasiert. Die Genpistole wurde laut Herstellerangabe an eine Heliumflasche angeschlossen und der Arbeitsdruck von 400 psi („pound per square inches“) eingestellt. Der Revolver der Genpistole wurde mit der benötigten Anzahl an Patronen beladen, d.h. pro Tier zwei Patronen mit je 2 µg DNA. Pro Immunisierung wurden so jeder Maus 4 µg je Plasmid-DNA in zwei nichtüberlappenden Schüssen auf die Bauchhaut appliziert.

Die biolistische Transfektion wurde dreimal im Abstand von jeweils einer Woche durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, jeweils unterschiedliche Stellen der Bauchhaut zu beschießen.

### **2.2.1.2 Proteinimmunisierungsmethoden**

#### **2.2.1.2.1 subkutane (s.c.) Immunisierung**

Zunächst wurde βGal (Sigma, Deisenhofen) in sterilem deionisiertem Wasser nach Herstellerangaben gelöst und in sterilem 1 x PBS auf 10 µg/ml eingestellt. 200 µl dieser Lösung wurden jeder Maus mit einer 1 ml Feindosierspritze in die Nackenfalte unter die Haut injiziert. Jede Maus wurde so mit 2 µg βGal immunisiert.

#### **2.2.1.2.2 intranasale (i.n.) Immunisierung**

Für die intranasale Immunisierung mit βGal wurden die Versuchstiere zunächst mit 250 µl einer 2,5%igen Avertin-Lösung betäubt.

Den sedierten Tieren wurde in Rückenlage 50 µl einer 1 mg/ml βGal-Lösung (Sigma, Deisenhofen, gelöst in 1 x PBS) oder 1 x PBS bei Kontrolltieren tröpfchenweise auf die Nasenlöcher pipettiert, so dass die Flüssigkeit von den Mäusen eingeatmet werden konnte.

### **2.2.2 Nicht-invasive Messung der Atemwegsreaktivität**

Die Atemwegsreaktivität (AR) bzw. der bronchoalveoläre Strömungswiderstand ist von verschiedenen Faktoren, wie der Größe und dem Alter des jeweiligen Individuums, abhängig. Sie bezeichnet eine Verengung der Atemwege, die aufgrund eines Reizes hin zunehmen kann. Dies dient zum einen der Anpassung der Ventilation, zum anderen wird das Lungengewebe vor dem zu tiefen Eindringen toxischer Substanzen geschützt.

Die Atemwegsreaktivität kann über das normale Maß hinaus erhöht sein, so dass es zu einer Atemwegshyperreaktivität (AHR) kommt. Dies ist bei obstruktiven Atemwegserkrankungen, wie z.B. dem allergischen Asthma, der Fall.

Die Messung der Atemwegsreaktivität wurde von der Asthma Core Facility unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Taube durchgeführt.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde an den Versuchstieren 24 Stunden nach der letzten intranasalen Provokation mit dem Allergen eine nicht-invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse einzeln in Kammern eines Ganzkörper-Plethysmographen gesetzt und für jedes Tier der Druck in der Kammer (P) während der normalen Atmung gemessen.

Durch ein Ableitungsrohr des Plethysmographen, das an einen Pneumatographen gekoppelt ist, ist es möglich Druckveränderungen in der Kammer zu messen, die aufgrund der Atembewegung der Maus zustande kommen. Durch die Atembewegung des Brustkorbes des Tieres wird die Luft in der Kammer komprimiert und wieder gedehnt.

Mit einem Potentiometer werden die Messwerte verstärkt und an einen Computer weitergeleitet.

Um festzustellen ob eine AHR vorliegt, unterzieht man die Versuchstiere einer Lungenfunktionsmessung während einer Provokation mit aerosolisiertem Methacholin (McH). Dabei wird untersucht, ob und wie schnell die Atemwege reagieren.

Zunächst wurde 5 min lang der Atemstrom ohne eine Provokation gemessen und aus den Werten der Tiere einer Gruppe der Mittelwert berechnet. Aus den gemessenen Werten wurde eine Baseline erstellt. Diese wurde gleich 100 gesetzt und alle prozentualen Abweichungen von dieser festgehalten.

Anschließend wurde je drei Minuten aerosolisiertes Methacholin verschiedener Konzentrationen (3,125; 6,25 mg/ml; 12,5 mg/ml; 25 mg/ml in 1 x PBS) in die Kammer geleitet, wo es von den Versuchstieren eingeatmet wurde.

Die bei der Atmung entstehende Druckänderung und somit die Änderung des Strömungswiderstandes wurde während den folgenden 5 min aufgezeichnet und von den Tieren einer Gruppe ein Mittelwert berechnet.

Die Gabe der unterschiedlichen Methacholindosen wurde jeweils durch eine siebenminütige Pause unterbrochen.

Aus dem durch eine Verengung der Bronchien bedingten Druckabfall der Kammer und dem Verhältnis der Maximaldrücke bei In- und Expiration wurde ein dimensionsloser Parameter ermittelt, Penh („enhanced pause“).

Hierbei steigt der Wert für die Penh mit einem zunehmenden Atemwiderstand.

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Kultivierung von Zellen

Alle Experimente mit der Zelllinie NIH3T3 wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Es wurden nur sterile Zellkulturmedien, die auf 37°C vorgewärmt wurden, und sterile Lösungen und Materialien verwendet.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>, unter gesättigter Wasserdampf-atmosphäre.

Aufgrund der Proliferation der Zellen und des Nährstoffverbrauchs wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium der adhären-ten Zellen mit einer sterilen Pipette abgenommen und die Zellen in frischem Kulturmedium vom Boden abgeschabt. Die gewünschte Menge abgelöster Zellen wurde in eine neue Kulturflasche überführt und frisches Kulturmedium hinzu gegeben.

### 2.3.2 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden mittels Abschaben in Nährmedium vom Flaschenboden geerntet und in ein 15 bzw. 50 ml Schraubdeckelgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde 7 min bei 300 g, bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, der Überstand entfernt und die sedimentierten Zellen in 0,5 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO

schützt die Zellmembranen beim Einfrieren vor Beschädigung durch Eiskristalle. Nach Überführen der resuspendierten Zellen in ein Einfrierröhrchen konnten sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einer Isopropanol-Einfrierbox weggefroren werden. Zur langfristigen Lagerung der Zellen wurden sie nach 24 h in flüssigen Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) überführt.

### 2.3.3 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden diese aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in einem Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  umgehend aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eisrest im Röhrchen vorhanden war. Die aufgetauten Zellen wurden dann in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß mit 15 ml kaltem Waschmedium überführt und anschließend 7 min bei 300 g, bei  $4^{\circ}\text{C}$  zur Entfernung von DMSO-Rückständen abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, verworfen und die Zellen in 1 ml Kulturmedium (siehe 2.1.4.6) resuspendiert, das in eine  $25\text{ cm}^2$  Zellkulturflasche mit weiteren 5 ml Medium überführt wurde. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel zur Entfernung von restlichem DMSO und toten Zellen.

### 2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Die geernteten Zellen wurden, je nach Volumen und Zelltyp, in ein 15/50 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und 7 min bei 300 g bei RT/ $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden zum ausschließen toter Zellen in Trypanblau verdünnt. Die Bestimmung der Zellzahl der Zellsuspension erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Es wurden vier Großquadrate ausgezählt und aus den Werten der Mittelwert gebildet, mit dem man unter Einbeziehung des Kammerfaktors ( $1 \times 10^4$ ) und der Verdünnung die Zellzahl pro ml ermitteln konnte.

Die Zellzahl konnte mit folgender Formel ermittelt werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Anzahl der gezählten Zellen} \times \text{Kammerfaktor} (10^4) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### **2.3.5 Präparation von Milzzellen**

Die Milzentnahme erfolgte aus der getöteten Maus unter sterilen Bedingungen. Die Milz wurde nach der Entnahme in eine Petrischale mit 20 ml kaltem Waschmedium überführt und zwischen zwei sterilen Mattrand-Objektträgern zerrieben. Anschließend wurde die Zellsuspension über ein Zellsieb ( $\varnothing$  40  $\mu$ m) in ein 50 ml Schraubdeckelröhrchen überführt. Objektträger und Petrischale wurden mit weiteren 10 ml Waschmedium abgespült und die Suspension ebenfalls über das Zellsieb in das Schraubdeckelröhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurde 8 Minuten bei 4°C und 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und nach Aufbruch des Zellsediments eine Lyse mit 1 ml Gey'schem Lysepuffer pro Milz durchgeführt. Nach einer Minute wurde die Lyse durch Zugabe von 10 ml kaltem Waschmedium je Milz abgestoppt, die Zellen erneut abzentrifugiert und noch zwei weitere Male mit kaltem Waschmedium gewaschen. Anschließend erfolgte eine Bestimmung der Lebendzellzahl.

### **2.3.6 Präparation von Lungenzellen**

Zur Herstellung von Zellsuspensionen aus Lungengewebe wurden diese unter sterilen Bedingungen den getöteten Mäusen entnommen und in ein 50 ml Schraubdeckelröhrchen mit 5 ml HEPES-Puffer bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Maximal drei Lungen pro Röhrchen wurden mit einer sterilen Pinzette dem Schraubdeckelröhrchen entnommen und in gentleMACS™ C Tubes mit 4,8 ml HEPES-Puffer überführt und mit 200  $\mu$ l Kollagenase Typ II (50 mg/ml) und 20  $\mu$ l DNase I (10 mg/ml) versetzt. Die Lungen wurden mit Hilfe des gentleMACS™ Dissociators (Programm m\_lung 01) für 8 sec mit Hilfe der in den Röhrchen befindlichen Rotoren zu einem groben Gewebepulver verarbeitet. Dieser wurde 30 min bei 300 upm geschüttelt. Anschließend wurden die Lungen mit Hilfe des gentleMACS™ Dissociators (Programm m\_lung 02) für 38 sec feiner zerkleinert. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb in ein 50 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und die Zellen bei 4°C und 300 g für 10 min abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und mit dem aufgebrochenen Zellsediment eine Gey'sche Lyse mit 1 ml Lysepuffer je Lunge für 90 Sekunden durchgeführt. Die Lyse wurde durch Zugabe von 5 ml Waschmedium je Lunge abgestoppt, die Zellen abzentrifugiert und noch



zwei weitere Male mit Waschmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und die Anzahl lebender Zellen ermittelt.

### 2.3.7 Präparation von Lymphknotenzellen

Nach der Immunisierung wurden immer die drainierenden Lymphknoten präpariert. D.h. nach Immunisierung mit der Genpistole die axialen und inguinalen und nach intranasaler Provokation die bronchialen und mediastinalen Lymphknoten. Die Entnahme erfolgte unter sterilen Bedingungen aus der zuvor getöteten Maus. Die entnommenen Lymphknoten wurden in eine Petrischale mit kaltem Waschmedium überführt und zwischen den rauen Seiten von zwei abgeflamten Objektträgern zerrieben. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (40  $\mu\text{m}$ ) in ein 15 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und 8 min bei 4°C und 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment aufgebrochen und gegebenenfalls eine Erythrozyten-Lyse mit 1 ml Gey'schem Lysepuffer durchgeführt. Nach einer Minute wurde die Lyse durch Zugabe von 10 ml kaltem Waschmedium abgestoppt, die Zellen erneut abzentrifugiert und noch zwei weitere Male mit kaltem Waschmedium gewaschen. Danach wurde die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und die Lebendzellzahl bestimmt.

### 2.3.8 Antigenspezifische Stimulation von Immunzellen zur Zytokinproduktion

Eine *in vitro* Stimulation von Immunzellen mit einem Antigen ermöglicht es, spezifisch die Zytokinproduktion dieser Zellen als Antwort darauf nachzuweisen. Die Zytokine werden in das Kulturmedium abgegeben und können mittels ELISA aus diesen Überständen bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Zytokinproduktion wurden Lymphknoten- bzw. Milzzellen zusammen mit dem entsprechenden relevanten Antigen ( $\beta$ -Gal 25  $\mu\text{g/ml}$ ) über einen Zeitraum von 72 Stunden bei 37°C und 10%iger CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert.

Je nach Zellzahl erfolgte die Kultur im 24-Loch-, bzw. 48-Loch-Format.

Zur Kultivierung der Zellen in 24-Loch-Platten wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in einem Gesamtvolumen von 1 ml kultiviert. Nach der 72stündigen Inkubation wurden je Loch vier mal 200  $\mu\text{l}$  Kulturüberstand in 96-Loch-Platten aliquotiert und bei -20°C bis zur Zytokinanalyse weggefroren.

Die Kultivierung im 48-Loch-Format erfolgte mit  $2 \times 10^6$  Zellen in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml. Aus diesen Ansätzen wurden je Vertiefung zweimal 200 µl in 96-Loch-Platten aliquotiert und bis zur Zytokinbestimmung mittels ELISA weggefroren.

### **2.3.9 CTL-EliSpot**

Mit Hilfe des CTL-EliSpots (**E**nzyme-**L**inked-**I**mmuno-**S**pot-Test) ist es möglich, die Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen nach Stimulation mit einem MHC-I restringierten Peptid (TPHPARIGL) zu bestimmen. Die Stimulation der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt zu einer Zytokinproduktion der Zellen. An den Stellen, an denen sich solche IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen befinden, wird vermehrt IFN- $\gamma$  an den mit Antikörper beschichteten Plattenboden gebunden. Diese IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen können dann als einzelne farbige Punkte auf einer Nitrozellulosemembran dargestellt werden.

Dazu wurde zunächst eine mit dieser Nitrozellulosemembran ausgekleidete 96-Loch-Mikrotiterplatte (Millipore) mit 50 µl eines unmarkierten Ratte-anti-Maus-IFN- $\gamma$ -Antikörpers in 1 x PBS in einer Konzentration von 10 µg/ml beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Tag des Organaufschlusses wurden zuerst unspezifische Bindungen durch Zugabe von FCS-haltigem Testmedium abgesättigt. Hierzu wurden die Platten unter sterilen Bedingungen zweimal mit jeweils 150 µl pro Loch 1 X PBS gewaschen und danach die Platte mit 200 µl Kulturmedium pro Loch für 2 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die zu untersuchenden Zellsuspensionen aufgetragen. Die Zellen wurden hierzu, nachdem die Blockierlösung wieder aus den Platten entfernt wurde, zu  $1 \times 10^6$  bzw.  $2 \times 10^5$  bei Milz- und Lymphknotenzellen und  $5 \times 10^4$  bzw.  $2 \times 10^4$  bei Lungenzellen in die Vertiefungen der Platte gegeben.

Jedem Ansatz wurden 250 U/ml rekombinantes humanes IL-2 zupipettiert. Pro Gruppe wurden je 4 Löcher ohne Peptid und 4 mit MHC-I restringiertem Peptid inkubiert. Hierzu wurde diesen 1 µg/ml des Peptids in die jeweiligen Vertiefungen hinzugegeben. Es erfolgte ein Ausgleich des Gesamtvolumens in allen Ansätzen auf jeweils 200 µl mit Testmedium.

Nach 22stündiger Inkubation des Testes bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> wurde die Testplatte zweimal mit Hilfe eines ELISA-Waschgerätes mit Waschpuffer gewaschen und restliche Flüssigkeit aus den Vertiefungen geklopft.

Die Detektion des gebildeten IFN- $\gamma$  erfolgte mit Hilfe eines spezifischen biotinylierten Detektionsantikörpers. Dieser anti-Maus-IFN- $\gamma$ -Antikörper wurde in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  in 1 x PBS/1% BSA in 50  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Platte erneut zweimal gewaschen und trockengeklopft. Es wurden 50  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung des 1:1000 verdünnten Enzyms Streptavidin-Peroxidase in 1 x PBS/1% BSA zugegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Das Enzym bindet über das Streptavidin an den biotinylierten Detektionsantikörper und setzt in einer weiteren Reaktion das daraufhin zugegebene Substrat AEC mit Hilfe von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das als Katalysator dient, zu einem unlöslichen roten Farbkomplex um.

Die zur Entwicklung des Testes benötigte AEC-Lösung wurde durch das Lösen einer AEC-Tablette in 2,5 ml DMF hergestellt. 525  $\mu\text{l}$  der AEC-Lösung wurden mit 10 ml 0,1 M Natrium-Acetatpuffer versetzt und die Lösung 30 min auf einem Magnetrührer gerührt, die AEC-Lösung anschließend durch einen 0,45  $\mu\text{m}$  Filter filtriert und 1  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  je ml Substratlösung hinzugegeben. Die Platten wurden 2 x mit Hilfe des ELISA-Waschgerätes gewaschen, trockengeklopft und 50  $\mu\text{l}$  Substratlösung je Loch zugegeben. Nach einer Inkubation von 2 bis 10 min waren rote Farbflecke zu erkennen. Durch Ausschlagen der Substratlösung aus der Platte wurde die Farbreaktion gestoppt, der Nitrozellulosemembran stützende Plattenboden daraufhin entfernt und die Platte über Nacht lichtgeschützt getrocknet. Die Auswertung des Tests erfolgte mit Hilfe einer EliSpot-Auswerteeinheit. Dabei wurden die einzelnen Farbpunkte anhand festgelegter Kriterien wie Größe, Intensität und Aussehen charakterisiert und anschließend ausgezählt.

### 2.3.10 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die Versuchstiere wurden mit Rompun/Ketamin getötet und mit 70%igem Ethanol eingesprüht. Der Brustkorb wurde geöffnet, das Abdomen unterhalb des Sternums entlang des Rippenbogens aufgeschnitten und durch eine Perforation des Zwerchfells auf Höhe des Herzens die Lunge zum Kollabieren gebracht.

Die Trachea wurde freigelegt, das darauf liegende Häutchen entfernt und anschließend mit einer Kanüle im oberen Bereich parallel zu den Verknorpelungen eine Öffnung in die Luftröhre geritzt. In diese wurde ein Braunüle eingeführt und mit Hilfe einer 1 ml Spritze 1 ml eiskaltes 1 x PBS/10% FCS in die Lunge gespült und direkt wieder in die Spritze zurück gesaugt. Die Spülflüssigkeit wurde in ein 15 ml Schraubdeckelröhrchen überführt, das

Volumen auf 50 µl genau bestimmt und die Zellen in der Lösung 10 min bei 4°C und 300 g abzentrifugiert.

Der zellfreie Überstand (BALF, BAL-Flüssigkeit) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Bestimmung der darin vorhandenen Zytokine mittels ELISA bei -20°C gelagert.

Das Zellsediment wurde aufgebrochen, die Zellen in 0,5 ml 1 x PBS aufgenommen und bis zur Bestimmung der Zellzahl auf Eis aufbewahrt. Die Zellen wurden zur Herstellung von Zytospinpräparaten verwendet, um die vorhandenen Leukozyten-Populationen in der BAL zu charakterisieren.

### **2.3.11 Herstellung von Zytospinpräparaten**

Nach der Bestimmung der Lebendzellzahl der in der BAL vorhandenen Zellen wurden Zytospinpräparate angefertigt. Zu den Zellen wurden zunächst 2 ml 1 x PBS zur Entfernung von restlichem FCS zugegeben, die Zellen 10 min bei 4°C und 300 g abzentrifugiert und in 50 µl je  $5 \times 10^5$  Zellen aufgenommen. Die Zellen wurden in den Trichter einer Zytospin-Apparatur pipettiert. Durch Zentrifugation bei 500 g für 5 min bei mittlerer Beschleunigung in einer Zytospin-Zentrifuge wurden die Zellen auf einen Objektträger aufgebracht und die vorhandene Flüssigkeit von einem Filter aufgesaugt.

Anschließend wurden die Objektträger luftgetrocknet und die unterschiedlichen Zellen mit Hilfe des Diff-Quick-Färbesets nach Herstellerangaben fixiert und angefärbt. Die Objektträger wurden mit destilliertem Wasser abgespült, um Reste der Färbelösungen zu entfernen, und danach luftgetrocknet. Die Zellen wurden auf dem Objektträger mit Entellan® und einem Deckgläschen eingedeckt.

### **2.3.12 Differenzierung der Zellen aus der BAL**

Aus dem bestimmten Volumen der entnommenen BAL-Flüssigkeit und der darin vorhandenen Gesamtzellzahl können die Zellzahlen der jeweiligen Zellpopulationen, bezogen auf ein Gesamtvolumen von 1 ml, ermittelt werden.

Die Zellen wurden mit Hilfe des Systemmikroskops Olympus BX50 mit integrierter Digitalkamera und dem Computerprogramm cellF+ differenziert und ausgezählt. Für jedes Versuchstier wurden 10 Aufnahmen eines Objektträgers gemacht (20-40fache Vergrößerung). Aufgrund ihrer Morphologie, Färbung und Größe konnten Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten sowie Erythrozyten differenziert und ausgezählt werden.

### Morphologie der in der BAL vorhandenen Zelltypen



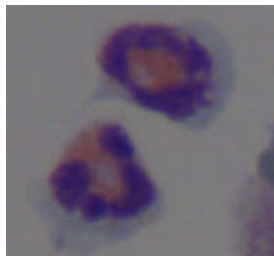
#### **Monozyten/Makrophagen**

Makrophagen sind für gewöhnlich die größten Zellen in der BAL. Sie sind phänotypisch variabel und unterschiedlich groß. Der Nukleus ist violett und das Zytoplasma blau gefärbt.



#### **Lymphozyten**

Lymphozyten sind kleiner als Monozyten und Granulozyten und haben klar abgegrenzte Konturen. Das Zytoplasma ist kaum sichtbar und das Chromatin des Zellkerns ist stark kondensiert und nach der Färbung dunkelblau angefärbt.



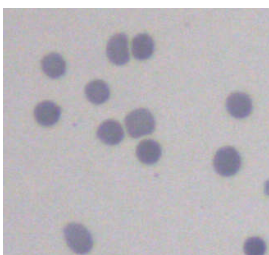
#### **Eosinophile Granulozyten**

Eosinophile Granulozyten haben im Zytoplasma rot gefärbte Granula und einen segmentierten, gelappten Nukleus, der blau gefärbt ist.



#### **Neutrophile Granulozyten**

Bei den neutrophilen Granulozyten ist das Zytoplasma farblos und der gelappte segmentierte Nukleus ist blau gefärbt.



#### **Erythrozyten**

Erythrozyten sind die kleinsten Zellen in der BAL. Sie sind kugelig, ohne Zellkern und grau bis hellrot gefärbt.

### **2.3.13 ELISA zur Bestimmung der Zytokinproduktion in Zellkulturüberständen und in den Überständen der BAL**

Mit Hilfe des Zytokin-ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay) wurde die Zytokine IL-5 und IFN- $\gamma$  in den Überständen von Milz- und Lymphknotenkulturen sowie der BAL quantitativ nachgewiesen.

Dazu wurde eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit 50  $\mu$ l des „Capture-Antikörpers“ verdünnt in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pro Vertiefung beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte zum Entfernen der Lösung mit Hilfe eines ELISA-Waschgerätes zweimal mit je 3 x 150  $\mu$ l PBS/0,05% Tween pro Loch gewaschen. Die Platte wurde zur Entfernung von Resten der Wachlösung ausgeklopft. Danach wurden mit 150  $\mu$ l pro Loch 1 x PBS/1% BSA unspezifische Bindungsstellen blockiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten ausgeklopft und 100  $\mu$ l der Proben mit einer geeigneten Verdünnung in 1 x PBS/1%BSA aufgetragen und seriell zweifach (BAL) bzw. dreifach (Kulturüberstände) 1:2 mit 50  $\mu$ l 1 x PBS/1% BSA titriert. 100  $\mu$ l des Standardzytokins wurden aufgetragen und seriell zweifach in 50  $\mu$ l 1 x PBS/1% BSA verdünnt. 50  $\mu$ l 1 x PBS/1% BSA wurde als Leerwertkontrolle in mindestens vier Vertiefungen aufgetragen. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Platten zweimal mit Waschpuffer mit Hilfe eines ELISA-Waschgerätes gewaschen und anschließend trockengeklopft. Daraufhin wurde ein spezifischer biotinylierter Detektionsantikörper in 1 x PBS/1% BSA verdünnt und in einem Volumen von 50  $\mu$ l pro Vertiefung hinzugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Die Platten wurden danach erneut zweimal mit Waschpuffer gewaschen, trockengeklopft und mit 50  $\mu$ l je Loch des Streptavidin-konjugierten Enzyms Peroxidase (1:2000 in 1 x PBS/1% BSA) 45 min bei RT inkubiert. Die Peroxidase bindet über das Streptavidin an den biotinylierten Antikörper. Sie setzt im letzten Schritt des ELISAs das farblose Substrat OPD mit Hilfe des als Katalysator dienenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in ein farbiges, photometrisch messbares Produkt um.

Die Platten wurden hierzu sorgfältig dreimal mit Waschpuffer gewaschen und durch Ausschlagen Reste der Lösung entfernt.

Je Vertiefung wurden 50  $\mu$ l OPD-Substratlösung (1 mg OPD/ml mit 1  $\mu$ l/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zugegeben. Dabei entsteht durch die Umsetzung des Substrats eine Gelbfärbung. Spätestens wenn in den Leerwerten eine leichte Gelbfärbung zu sehen war wurde der Test durch Zugabe

von 50 µl/Loch 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Hierbei erfolgte ein Farbumschlag von gelb nach orange.

Die optische Dichte der einzelnen Proben wurde spektralphotometrisch bei 490 nm gemessen. Dabei wurden die Messwerte der Leerwerte von denen der Proben abgezogen.

Mit den gemessenen Extinktionswerten der Proben und des Standards wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Für die Berechnung der Zytokinkonzentration in einer Probe wurden die Zytokinkonzentration des Standards und die Verdünnung der Probe bei einer optischen Dichte von 0,2 in Bezug gesetzt.

### **2.3.14 Serumgewinnung**

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Immunisierung wurde den Versuchstieren im Anschluss daran Blut aus dem Augenhintergrund entnommen. Den Mäusen wurde durch leichtes drehen mit einer Glaspasteurpipette Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und eine Stunde bei RT inkubiert. Durch die Inkubation kommt es zur Defibrinierung des Bluts und es wurde im Anschluss ein entstandener Blutkuchen mit einer schmalen, abgerundeten Pinzette entfernt und verworfen.

Zur Gewinnung des Serums wurde das Blut 5 min bei 7000 g bei RT zentrifugiert, wodurch die übrigen zellulären Bestandteile vom Serum abgetrennt wurden. Das klare Serum wurde in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Bestimmung des vorhandenen Immunglobulin-Titers mittels ELISA bei -20°C gelagert.

### **2.3.15 ELISA zur Bestimmung antigenspezifischer Immunglobuline (Ig)**

Mit Hilfe des Ig-ELISAs wurden die antigenspezifischen Immunglobuline IgE, IgG1 und IgG2a in den Seren von Versuchstieren nachgewiesen.

Dazu wurde eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit 100 µl des Antigens (βGal) in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pro Vertiefung beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Das βGal wurde hierbei in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt.

Die elfte Reihe der 96-Loch Platte wurde bei der Beschichtung ausgelassen. Sie dient als Kontrolle für die Antigenspezifität der zum Nachweis verwendeten Antikörper.

Nach der Inkubation wurden die Platten zum Entfernen der Lösung ausgeschlagen und mit 150 µl pro Loch 1 x PBS/1% BSA unspezifische Bindungsstellen blockiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten ausgeklopft und die Seren mit einer geeigneten Verdünnung seriell 1:2 über 10 Stufen mit 100 µl titriert. Die Seren wurden hierzu mit einem Volumen von 200 µl in die nicht beschichtete elfte Kontrollreihe vorgelegt und von dort aus in 1 x PBS/1% BSA von Reihe 1 aus bis zur Reihe 10 titriert. In Reihe 12 wurde nur 100 µl 1 x PBS/1% BSA gegeben und kein Serum. Sie dient als Leerwertkontrolle. Die Seren wurden für 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden die Platten zweimal mit Waschpuffer mit Hilfe eines ELISA-Waschgerätes gewaschen und anschließend trockengeklopft. Daraufhin wurde ein spezifischer biotinylierter isotypspezifischer Detektionsantikörper in einem Volumen von 100 µl pro Vertiefung hinzugegeben. Die spezifischen Antikörper gegen IgG1 und IgG2a (Ziege anti-Maus-IgG1/IgG2a) wurden in 1 x PBS/1% BSA 1:5000 verdünnt und anschließend für 45 min bei RT auf der Platte inkubiert.

Die Detektion von antigenspezifischem IgE erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden 100 µl pro Loch eines in 1 x PBS/1% BSA 1:1000 verdünnten Primärantikörpers (Ratte-anti-Maus-IgE EM95-3) für 45 min bei RT inkubiert. Die Platte wurde danach zweimal mit Waschpuffer gewaschen und 45 min bei RT mit 100 µl pro Vertiefung eines biotinylierten Sekundärantikörper (Maus-anti-Ratte-IgG1:1000 in 1 x PBS/1% BSA) inkubiert.

Die Platten wurden danach erneut zweimal mit Waschpuffer gewaschen, trockengeklopft und mit 100 µl je Loch des Streptavidin-konjugierten Enzyms Peroxidase (1:2000 in 1 x PBS/1% BSA) 45 min bei RT inkubiert. Die Peroxidase bindet über das Streptavidin an den biotinylierten Antikörper. Sie setzt im letzten Schritt des ELISAs das farblose Substrat OPD mit Hilfe des als Katalysator dienenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in ein farbiges, photometrisch messbares Produkt um.

Die Platten wurden hierzu sorgfältig dreimal mit Waschpuffer gewaschen und durch Ausschlagen Reste der Lösung entfernt.

Je Vertiefung wurden 100 µl OPD-Substratlösung (1 mg OPD/ml mit 1 µl/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zugegeben. Dabei entsteht durch die Umsetzung des Substrats eine Gelbfärbung. Spätestens wenn in den Leerwerten eine leichte Gelbfärbung zu sehen war wurde der Test durch Zugabe von 100 µl/Loch 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Hierbei erfolgte ein Farbumschlag von gelb nach orange.

Die optische Dichte der einzelnen Proben wurde spektralphotometrisch bei 490 nm gemessen. Dabei wurden die Messwerte der Leerwerte von denen der Proben abgezogen.



Mit den gemessenen Extinktionswerten der Proben wurde mittels linearer Regression der Antikörpertiter bei einer optischen Dichte von 0,2 ermittelt.

### **2.3.16 Transiente Transfektion von Zellen mit Fugene HD**

Für die Transfektion von NIH-3T3-Zellen mit Expressionsvektoren wurden am Vortag 2 bis  $5 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in eine 24-Loch-Platte ausgesät und in 1 ml Kulturmedium (siehe 2.1.4.6) kultiviert.

Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Fugene HD. Dazu wurde 1 µg DNA zusammen mit 4 µl des Transfektionsreagenzes und 20 µl serumfreien IMDM in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 15 min bei RT inkubiert.

Wurden Plasmide verwendet, die selbst keinen Fluoreszenzmarker tragen, wurde zur fluoreszenzmikroskopischen Kontrolle der Transfektionseffizienz dem Ansatz zusätzlich 200 ng eines EGFP Konstruktes (pCI-CMV-EGFP) zugegeben.

Bei den zu transfizierenden Zellen wurde das Medium abgenommen und durch 250 µl frisches Kulturmedium ersetzt. Diesem wurde der Transfektionansatz zugegeben und durch leichtes Schwenken auf den Zellen verteilt.

Nach einer vier- bis fünfstündigen Inkubation bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> wurde 1 ml frisches Kulturmedium zu den Zellen hinzugegeben und die Zellen bis zur fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung der Transfektionseffizienz weitere 24h bis 48h kultiviert.

### **2.3.17 Nachweis von Tryptophan und Kynureninen mittels HPLC**

Zur Überprüfung der Funktionalität von IDO-Expressionsplasmiden wurden NIH-3T3-Zellen mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Fugene HD wie in 2.3.16 beschrieben transfiziert und anschließend in den Überständen dieser Zellen der Tryptophan- und Kynurenin-Gehalt mittels HPLC bestimmt.

In den Ansätzen erfolgte nach 24 h nach der Transfektion ein Mediumwechsel, wobei den Zellen 0,5 ml RPMI Medium supplementiert mit 20 mM Tryptophan zugegeben wurde. Als Negativkontrolle wurden mit einem Leervektor transfizierte bzw. untransfizierte Zellen und als Positivkontrolle mit dem zuvor schon getesteten pCi-CMV-IDO Konstrukt transfizierte

Zellen mitgeführt. Nach 24- bzw. 48stündiger Kultivierung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Überstände von den Zellen abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bis zur Analyse mittels HPLC bei -20°C aufbewahrt.

Die Zellen selbst wurden zur Isolierung von RNA in 250 µl Puffer RLT+ lysiert und bei -20°C bis zur Durchführung der RNA-Isolierung gelagert.

IDO (Indolamine-2,3-Dioxygenase) ist das Schlüsselenzym des Tryptophan-Katabolismus. Sie katalysiert den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan, wobei Kynurenine als Abbauprodukte entstehen.

Mit Hilfe der HPLC (**H**igh-**P**ressure-**L**iquid-**C**hromatography) können lösliche Stoffe getrennt und quantitativ sowie qualitativ mittels Säulenchromatographie analysiert werden.

Die Auftrennung der Stoffe erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der Substanzen in einer flüssigen und einer stationären Phase. Die Stoffe verweilen aufgrund dessen unterschiedlich lange in der Säule und können mit einem Photometer bei ihrer Elution detektiert werden.

So konnten die Konzentrationen von Tryptophan und Kynureninen in den Kulturüberständen bestimmt werden.

Die Durchführung und Auswertung der HPLC mit den Kulturüberständen erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ellen Closs im Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin Mainz.

### **2.3.18 Magnetische Zellseparation mit Hilfe der MACS<sup>®</sup>-Technologie - Positive Anreicherung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Die MACS<sup>®</sup>-Technologie ermöglicht es bestimmte Zellpopulationen aus einem Gemisch von Zellen zu separieren. Die Separation erfolgte laut Herstellerprotokoll.

Die Milz- und Lymphknotenzellen wurden wie in 2.3.5 und 2.3.7 beschrieben isoliert und anschließend die Lebendzellzahl der Zellsuspension bestimmt.  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in je 90 µl gekühltem MACS-Puffer aufgenommen und mit 10 µl der entsprechenden magnetischen Micro Beads resuspendiert und 15 min bei 4°C inkubiert. Die für die Positivaufreinigung verwendeten Micro Beads bestehen zum einen aus monoklonalen Antikörpern, die hochaffin an bestimmte Oberflächenmoleküle auf der Zelle binden. Diese Antikörper sind zum anderen an magnetische Partikel gekoppelt, durch die eine magnetische Separation ermöglicht wird.

Während der Inkubation binden diese an bestimmte Oberflächenmoleküle der Zellen.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit dem 10fachen Volumen an MACS-Puffer gewaschen und anschließend 10 min bei 4°C und 300 g zentrifugiert.

Anschließend erfolgte die magnetische Separation der Zellen. Dafür wurde eine MS-Trennsäule in das magnetische Feld eines OctoMACS<sup>TM</sup>-Separators eingespannt und mit 500 µl MACS-Puffer äquilibriert. Die abzentrifugierten Zellen wurden in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und maximal  $1 \times 10^8$  Zellen auf eine MS-Trennsäule geladen. Die unmarkierten Zellen wandern dabei durch die Säule hindurch während die an die magnetischen Beads gekoppelten Zellen aufgrund des Magnetfeldes in der Säule zurückbleiben. Die Säule wurde danach dreimal mit 500 µl MACS-Puffer gewaschen und anschließend dem Magneten entnommen. Die Zellen wurden mit 1 ml MACS-Puffer durch Herausdrücken mit Hilfe eines Säulenstempels aus der Säule eluiert. Die Zellen wurden 10 min bei 4°C und 300 g abzentrifugiert und anschließend die Lebendzellzahl bestimmt.

### 2.3.19 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt eine Untersuchung verschiedener Zelleigenschaften. Hierbei können (semi-)quantitativ Proteine nachgewiesen werden, die sich entweder auf der Zelloberfläche oder auch in der Zelle befinden. Diese können durch die Bindung epitopenspezifischer Antikörper an diese Strukturen nachgewiesen werden. Hierbei werden entweder direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörper verwendet oder unmarkierte Primärantikörper, die dann durch die Verwendung eines fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen werden.

Zusätzlich wird eine Isotypenkontrolle mitgeführt, um nichtspezifische Bindungen eines Antikörperisotypen zu bestimmen. Hierbei wird ein Antikörper derselben Spezies und desselben Isotyps verwendet.

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen, die sich in Lösung befinden, durch eine Kapillare hindurch gesaugt und passieren im Sensormodul des Durchflusszytometers einzeln einen Laserstrahl. Dort wird der Fluoreszenzfarbstoff bei 488 nm angeregt und die Zellen emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses kann mit Hilfe von Fluoreszenzdetektoren analysiert werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät stehen drei Fluoreszenzdetektoren zur Verfügung. FL1 misst die Emission bei 500-560 nm (grüner Bereich), FL2 bei 540-630 nm (roter Bereich) und FL3 bei über 650 nm.

Neben der Emission von Fluoreszenzsignalen können auch noch die Größe und Granularität einer Zelle bestimmt werden. Diese Informationen erhält man aufgrund des Vorwärtstreulichts, welches als Maß für die Größe der Zelle dient und im Forward Scatter (FSC) detektiert wird. Das Seitwärtstreulicht, welches mit Hilfe des Side Scatters (SSC) detektiert wird, dient als Maß für Granularität der Zelle.

Bei der Messung wurden pro Probe 10.000 lebende Zellen gemessen, und mit der CellQuest<sup>TM</sup>-Software von BD Biosciences analysiert. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo (FlowJow, Ashland, USA).

### **2.3.19.1 Oberflächenfärbung zur Kontrolle der Reinheit von Zellen nach der MACS-Separation**

Nach der MACS-Isolierung wurde die Reinheit der Zellen mit Hilfe einer Oberflächenfärbung kontrolliert. Dazu wurden je  $5 \times 10^5$  Zellen in FACS-Röhrchen verteilt und 10 min bei 4°C und 300g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 25 µl 2.4G2-Überstand zur Absättigung von Fc-Rezeptoren aufgenommen. Die Proben wurden auf dem Reagenzglasschüttler gemischt und anschließend für 10 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die entsprechenden direkt Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper in 25 µl FACS-Medium verdünnt, zu den Zellen pipettiert und auf dem Reagenzglasschüttler gemischt. Die Zellen wurden 20 min im Dunkeln bei 4°C mit dem Antikörpercocktail inkubiert wobei sie nach der Hälfte der Zeit erneut auf dem Reagenzglasschüttler durchmischt wurden.

Der Absättigungsüberstand mit den überschüssigen Antikörpern wurde durch Zugabe von 1 ml FACS-Medium und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 300 g von den Zellen gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen zur Fixierung in 400 µl PBS/0,7% PFA aufgenommen, durchmischt und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

### **2.3.19.2 Oberflächenfärbung und intrazelluläre FoxP3-Färbung**

Mit Hilfe der FoxP3-Färbung lassen sich regulatorische T-Zellen nachweisen. Für die Färbung wurde das FoxP3 Färbeset von Miltenyi (Bergisch Gladbach) verwendet. Alle genannten Puffer wurden gekühlt verwendet.

Färbeschema:

- 1: CD4-Cy5PE / Ratte-IgM-FITC / Maus-IgG1-PE
- 2: CD8-Cy5PE / Ratte-IgM-FITC / Maus-IgG1-PE
- 3: CD4-Cy5PE / CD25-FITC / FoxP3-PE
- 4: CD8-Cy5PE / CD25-FITC / FoxP3-PE
- 5: Ratte-IgG2a-Cy5PE / Ratte-IgM-FITC / Maus-IgG1-PE
- 6: Ratte-IgG2a-Cy5PE / CD25-FITC / Maus-IgG1-PE
- 7: Ratte-IgG2a-Cy5PE / Ratte-IgM-FITC / FoxP3-PE

Jeweils  $5 \times 10^5$  der wie in 2.3.5 und 2.3.7 beschrieben isolierten Zellen wurden auf FACS-Röhrchen verteilt. Die Färbungen 1 bis 4 wurden für alle Gruppen durchgeführt und die Färbungen 5 bis 7 nur für eine Gruppe. Diese dienen der Durchführung der Voreinstellungen am Durchflusszytometer. Die Zellen wurden zusammen mit 1 ml FACS-Puffer 10 min bei 4°C und 300g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 25 µl 2.4G2-Überstand zur Absättigung unspezifischer Bindungen versetzt und auf dem Reagenzglasschüttler durchmischt.

Nach einer 10minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Antikörper zur Oberflächenfärbung bzw. die Isotypenkontrollantikörper in einem Volumen von 25 µl hinzugegeben und nach dem Durchmischen für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert, wobei die Proben nach der Hälfte der Zeit erneut durch Rütteln auf dem Reagenzglasschüttler durchmischt wurden.

Nach der Inkubation wurden die Zellen nach Zugabe von 1 ml FACS-Puffer 10 min bei 4°C und 300 g abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Pro Röhrchen wurden 500 µl kalte, frisch angesetzte Fix/Perm-Lösung (Miltenyi-FoxP3 Staining Kit) bestehend aus 1 Teil Lösung 1 und 3 Teilen Lösung 2 hinzugegeben, die Röhrchen auf dem Reagenzglasschüttler gerüttelt und 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von 2 ml FACS-Puffer abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Proben mit 1 ml frisch angesetzten Permeabilisierungspuffer (Miltenyi-FoxP3 Staining Kit), bestehend aus 1 Teil 10 x Perm und 9 Teilen Aqua dest,

versetzt, gerüttelt und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 50 µl 2.4G2, verdünnt in Permeabilisierungspuffer, aufgenommen, auf dem Reagenzglasschüttler gerüttelt und 5 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Zu den Proben wurden anschließend 5 µl des FoxP3 Antikörpers bzw. des entsprechenden Isotypkontrollantikörpers hinzupipettiert. Die Proben wurden auf dem Reagenzglasschüttler gemischt und 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert, wobei sie nach 15 min erneut gerüttelt wurden. Die nicht gebundenen Antikörper wurden nach der Inkubation durch Zugabe von 1 ml Permeabilisierungspuffer und anschließende 10minütige Zentrifugation ausgewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 400 µl PBS/0,7% PFA, aufgenommen, und bis zur durchflußzytometrischen Bestimmung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm. Eine Aussage über die Reinheit der DNA lässt sich anhand des Absorptionsquotienten treffen. Dieser setzt sich aus den Absorptionswerten bei 260 und 280 nm zusammen und sollte bei DNA-Lösungen zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Mit der Messung der Absorption bei 280 nm kann eine Verunreinigung mit Proteinen nachgewiesen werden.

In einer Quarzküvette wurde zunächst mit 100 µl H<sub>2</sub>O dest. der Leerwert bestimmt. Danach wurden die Proben in einer Verdünnung von 1:100 in H<sub>2</sub>O dest gemessen.

Es wurde eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht hierbei einer DNA-Konzentration von ca. 50 µg/ml.

### 2.4.2 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäuren anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern in einem homogenen elektrischen Feld je nach Größe unterschiedlich schnell zur Anode, wodurch sie sich ihrer Größe nach auftrennen. Die Größe der Fragmente kann mit Hilfe eines DNA-Größenstandards bestimmt werden.

Zur Herstellung des Agarosegels wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1 x Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (TAE)- Puffer in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Nach Abkühlen der Lösung wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben und die Lösung in eine horizontale Gelkammer gegossen, in die ein Kamm für die Herstellung von Geltaschen eingesetzt wurde. Nach der Polymerisation wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer mit 1 x TAE überführt.

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 5 x DNA-Ladepuffer versetzt und anschließend in die Geltaschen pipettiert.

Durch Anlegen einer Spannung je nach Größe des Gels zwischen 90 V und 120 V und einer Laufzeit von ca. 60-90 min konnten die DNA-Fragmente, durch das zwischen die Basen interkalierte Ethidiumbromid, unter UV-Licht bei 310 nm sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

### 2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht es, verschiedene spezifische Nukleinsäureabschnitte zu amplifizieren. Hierbei macht man sich die Eigenschaft der Polymerasen zu Nutze, einzelsträngig vorliegende DNA zu duplizieren. Die DNA-Polymerase benötigt ein freies 3'-OH-Ende zum Beginn der DNA-Synthese. Diese freien Enden werden in Form von Oligonukleotiden (Primern) dem PCR-Ansatz beigelegt.

Die verwendeten Primer müssen komplementär zu einer Teilsequenz links und rechts des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts sein. Für die PCR wird ein Primerpaar so gewählt, dass der zu amplifizierende Bereich von ihnen flankiert wird und ein Primer an den „sense“ und einer an den „antisense“ Strang der DNA bindet.

Die Primer binden am Ende eines einzelsträngigen DNA-Stranges, wodurch die Synthese eines neuen Stranges ermöglicht wird. Diese DNA-Einzelstränge entstehen dadurch, dass die DNA zu Beginn der PCR 5 min erhitzt und somit die beiden Stränge getrennt (denaturiert) werden. Anschließend wird die DNA abgekühlt, damit die Primer über Wasserstoffbrücken an die Zielsequenzen an den Enden des zu amplifizierenden Bereichs binden können.

Danach verlängert die DNA-Polymerase die Primer, indem sie Nukleotide anhängt, wobei der Einzelstrang als Matrize dient.

Durch wiederholte Denaturierung und Synthese neuer DNA wird das gewünschte DNA-Stück vervielfältigt.

### Ansatz:

200 ng cDNA

1 µl dNTP (10 mM pro dNTP)

1 µl Primer 1 sense

1 µl Primer 2 antisense

0,5 ml Taq-Polymerase

ad 20 µl aqua dest.

---

$\Sigma = 20 \mu\text{l}$

Das Reaktionsgemisch wurde in 500 µl PCR-Gefäßen zusammenpipettiert.

Für die Wasserkontrolle wurde die DNA in einem Ansatz durch steriles entsalztes Wasser ersetzt.

PCR-Programm:

| Zyklus | Zyklenzahl | Zeit   | Temperatur | Phasen        |
|--------|------------|--------|------------|---------------|
| 1      | 1          | 1 min  | 94°C       | Denaturierung |
| 2      |            | 1 min  | 64°C       | Annealing     |
| 3      |            | 30 sec | 72°C       | Elongation    |
| 4      | 1          | 1 min  | 94°C       | Denaturierung |
| 5      |            | 1 min  | 62°C       | Annealing     |
| 6      |            | 30 sec | 72°C       | Elongation    |
| 7      | 34         | 1 min  | 94°C       | Denaturierung |
| 8      |            | 1 min  | 60°C       | Annealing     |
| 9      |            | 30 sec | 72°C       | Elongation    |
| 10     | 1          | 1 min  | 94°C       | Denaturierung |
| 11     |            | 1 min  | 60°C       | Annealing     |
| 12     |            | 4 min  | 72°C       | Elongation    |
| 13     | 1          | ∞      | 4°C        | Stopp der PCR |



#### **2.4.4 Quantitative („Realtime“)-PCR**

Bei der „Realtime PCR“ handelt es sich um eine Methode zur quantitativen Untersuchung der mRNA-Expression von Genen.

Bei der „Realtime PCR“ werden die PCR-Produkte nach jedem Zyklus durch den in die DNA interkalierenden Farbstoff SYBR Green markiert. So können nach jedem Zyklus die neu entstandenen Produkte durch Anregung der Fluoreszenz detektiert werden. Hierbei korreliert die Menge an gebildeter doppelsträngiger DNA mit der Fluoreszenzintensität.

Für die quantitative PCR wurde in dieser Arbeit der „Absolute QPCR SYBR®Green Mix“ (Thermo Fisher Scientific, Bonn) verwendet. Dieser enthält neben dem SYBR-Green 490 noch einen Reaktionspuffer, dNTP's, eine Polymerase und den zusätzlichen Fluoreszenzfarbstoff ROX. Dieser dient während der PCR als Beladungskontrolle.

Die spezifischen Primer wurden als Primer-Mix bestehend aus „sense“- und „antisense“-Primer in einer Konzentration von jeweils 1 pmol/μl hinzugefügt.

Reaktionsgemisch für einen Ansatz:

1,75 μl Primer- Mix (je 1pmol/μl)  
9,75 μl H<sub>2</sub>O (Aqua B. Braun, B.Braun, Melsung)  
12,5 μl SYBR Green 490-Lösung  
1 μl cDNA (200ng/μl)

---

$\Sigma = 25 \mu\text{l}$

Zunächst wurde die cDNA (1 μl) in die Vertiefungen einer Thermo-96-Loch-Platte (Corning) pipettiert und anschließend 24 μl des Reaktionsgemisches zugegeben. Die Platte wurde mit einer Abdeckfolie (Absolute QPCR Seal, Abgene, Hamburg) sorgfältig verschlossen und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Die Platte wurde bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Die Messung erfolgte im Thermocycler nach folgendem Protokoll:

| <b>Zyklus</b> | <b>Zyklenzahl</b> | <b>Zeit</b>                | <b>Temperatur</b>    |
|---------------|-------------------|----------------------------|----------------------|
| 1             | 1                 | 15 min                     | 95°C („Hot-Start“)   |
| 2             | 50                | 15 sec<br>1 min            | 95°C<br>60°C         |
| 3             | 1                 | 30 sec<br>30 sec<br>15 sec | 95°C<br>60°C<br>95°C |

#### **2.4.5 Analytische Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA**

Zur DNA-Analyse wurden sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet. Diese Restriktionsenzyme erkennen spezifisch kurze definierte Nukleotidsequenzen der zu schneidenden DNA-Moleküle und schneiden an bestimmten Stellen innerhalb dieser Erkennungssequenz. Bei der Erkennungssequenz handelt es sich um Palindrome, das heißt, man findet dieselbe Folge von vier bis acht Nukleotiden auf beiden DNA-Strängen in gegenläufiger Orientierung.

Bei der Restriktionsspaltung entstehen doppelsträngige DNA-Moleküle mit einzelsträngigen Überhängen, den so genannten „sticky ends“ (klebrige Enden). Diese Überhänge erlauben es, dass sich komplementäre Überhänge eines anderen DNA-Moleküls mit Hilfe von Wasserstoffbrücken damit paaren.

Die Ansätze enthielten neben der zu analysierenden DNA, die entsprechenden spezifischen Enzyme und den bestmöglichen Reaktionspuffer.

##### Ansatz:

1 µg DNA

0,5 µl Enzym (10 U/µl)

2 µl Puffer (10x)

ad 20 µl aqua dest.

Der Ansatz wurde zum Verdau 90 min oder über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.4.6 Transformation elektrokompenter Bakterien**

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde diese in kompetente Bakterien des *Escherichia coli* Stammes TOP10 transformiert. Bei der Elektroporation der Bakterien kommt es durch einen kurzen Elektroschock zu einem kurzzeitigen Aufbrechen des positiv geladenen Mureinsacculus und somit zu einer Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterienzelle.

Pro Ansatz wurden 50 µl der Bakterien mit 200 ng Plasmid-DNA in einem vorgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäß resuspendiert. Der Ansatz wurde anschließend in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette überführt und die elektrokompenten Zellen bei 2,1 kV, 200 Ω und 25 µF im Elektroporator transformiert.

Die Bakterien wurden zügig in 200 µl warmen LB-Medium aufgenommen und in ein 15 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Nach der Transformation wurden weiterführende größere Flüssigkulturen angesetzt. Zur Plasmid-Minipräparation wurden 5 ml Kulturen in 15 ml Schraubdeckelröhrchen angesetzt, für die Midipräparation 250 ml Kulturen in 500 ml Erlenmeyerkolben und für die Plasmid-Maxipräparation 500 ml Kulturen in 1 l Erlenmeyerkolben. Die Kulturen wurden in LB-Medium mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) angesetzt und über Nacht unter schütteln bei 37°C inkubiert.

### **2.4.7 Aufreinigung von Plasmid-DNA**

#### **2.4.7.1 Plasmid-Mini-/Midi-/Maxipräparation**

Für die DNA-Minipräparation wurden 5 ml LB-Medium in einem 15 ml Schraubdeckelröhrchen mit 50 µg/ml des entsprechenden Antibiotikums versetzt, mit Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Für die Midi- bzw. Maxipräparation wurden 250 bzw. 500 ml Kulturen über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen wurde für kleinere DNA-Mengen das QIAprep® Spin Miniprep Kit und für größere DNA-Mengen das QIAGEN® Plasmid Midi bzw. Maxi Kit nach Anleitung des Herstellers verwendet.

Der Aufschluss der Bakterien zur DNA-Präparation beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse. Die so isolierte Plasmid-DNA wurde an eine äquilibrierte Säule gebunden, die aus

einem Gelbett mit einem Anionenaustauscherharz besteht. Anschließend werden Verunreinigungen, wie z.B. Proteine und RNA durch Waschen entfernt, die Plasmid-DNA aus der Säule eluiert und dann mit Isopropanol präzipitiert und anschließend mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl H<sub>2</sub>O dest. aufgenommen. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

### **2.4.7.2 Isopropanol-Minipräparation**

1,5 ml einer Bakterienkultur wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 5 min bei 14000 upm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in 250 µl Puffer P1 (QIAGEN) resuspendiert. Zur Suspension wurden 250 µl P2-Puffer (QIAGEN) zur Lyse der Bakterien hinzugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden zur Neutralisation 350 µl Puffer P3 (QIAGEN) hinzugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Suspension wurde 10 min bei 12500 g zentrifugiert und der plasmidhaltige Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol vermischt. Die Fällung der Plasmid DNA erfolgte bei -20°C für 30 min oder bei -80°C für 10 min. Die gefällte Plasmid-DNA wurde im Anschluss 10 min bei 12500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNA mit 0,5 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Hierzu wurde die DNA mit dem Ethanol 10 min bei 12500 g zentrifugiert und anschließend wieder vorsichtig abpipettiert. Die DNA wurde an der Luft getrocknet, in 40 µl deionisiertem Wasser aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

### **2.4.7.3 Endotoxinfreie Aufreinigung von Plasmid DNA**

Zur Herstellung von Gold-Patronen für die biolistische DNA Immunisierung wurde ausschließlich endotoxinfreie DNA verwendet.

Die endotoxinfreie Aufreinigung von Plasmid DNA erfolgte aus 250 bzw. 500 ml Kulturen mit Hilfe des EndoFree Plasmid Midi-/Maxi-Kits von QIAGEN® nach Herstellerangaben.

### **2.4.8 Fällung von DNA**

Zu der zu fällenden DNA wurde das 2,5 fache Volumen Ethanol absolut und 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,3 gegeben. Die Fällung erfolgte über 30 min bei -20 °C oder 10 min bei -80°C. Anschließend wurde die DNA 20 min bei 12500 g, bei RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und 100 µl 70% Ethanol zugegeben. Danach wurde erneut 20 min bei 12500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA luftgetrocknet und anschließend in 30 µl H<sub>2</sub>O dest. aufgenommen.

### **2.4.9 RNA-Isolierung**

In dieser Arbeit wurde RNA aus transfizierten, sowie aus Milz- und Lymphknotenzellen mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben präpariert.

Bei der Herstellung von RNA ist auf eine RNase freie Umgebung zu achten. Da RNasen auf allen Körperoberflächen vorkommen ist es wichtig Handschuhe zu tragen und alle verwendeten Gebrauchsgegenstände RNase-frei zu halten. Des Weiteren wurden alle für die RNA-Isolierung benötigten Arbeitslösungen mit DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser angesetzt. Der Enzyminhibitor DEPC deaktiviert eventuell vorhandene RNasen im Wasser.

Vor der Präparation wurde der Arbeitsplatz sorgfältig mit 70%igem Ethanol gereinigt und es wurden ausschließlich Pipetten verwendet, die nur für die RNA-Isolierung eingesetzt wurden.

Die Zelllysate zur RNA-Gewinnung wurden bis zur RNA-Isolierung in 250 µl des Lysepuffers RLT+ bei -20°C gelagert und zur Präparation auf Eis aufgetaut. Der Lysepuffer enthält chaotrope Ionen. Diese zerstören die dreidimensionale Struktur von Proteinen und somit auch die Proteine der Zellwände. Dadurch werden die Zellen lysiert.

Die Lysate wurden mit Hilfe einer QIAshredder-Zentrifugensäule geklärt und das Lysat über eine gDNA-Eliminatorsäule gegeben, anschließend mehrfach zur Entfernung von Salzen gewaschen und die RNA mit RNase freiem Wasser aus der Säule eluiert.

Die so gewonnene RNA wurde zum Teil direkt für eine Reverse Transkription (2.4.10) eingesetzt und der Rest bei -80°C gelagert.

#### **2.4.10 Reverse Transkription**

Die Reverse Transkription dient dazu, eine RNA-Matrize mit Hilfe einer Reversen Transkriptase enzymatisch in cDNA (komplementäre DNA) umzuschreiben. Bei der Reversen Transkriptase handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Sie fügt anhand einer vorhandenen RNA-Matrize komplementäre dNTPs an. Den Startpunkt für die Reverse Transkription bilden Primer, die sowohl genspezifisch und unspezifisch sein können und an die einzelsträngige RNA binden.

Die Reverse Transkription wurde mit dem „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ (BioRad) durchgeführt. Dieses Kit beinhaltet das Enzym (iScript™ Reverse Transkriptase), und eine 5 x iScript-Reaktionsmischung. Diese besteht aus dNTPs und zwei verschiedenen Arten von Primern. Bei den Primern handelt es sich um einen Oligo(dT)-Primer, der an den Poly-A-Schwanz der RNA bindet und einen Random Hexamer-Primer, der aus randomisiert kombinierten 6bp großen Abschnitten besteht und zufällig statistisch verteilt an die RNA bindet.

Bei der Reversen Transkription wurden zuerst 11 µl RNA mit 4 µl Nuklease-freiem Wasser, 4 µl 5x iScript-Reaktionsmischung und 1 µl iScript Reverse Transkriptase in einem 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß gemischt.

Das Reaktionsgemisch wurde in einem Thermocycler zunächst für 5 min bei 25 °C, dann für 40 min bei 42°C und zuletzt für 5 min bei 85°C inkubiert.

Im Anschluss wurde der cDNA-Gehalt jeder Probe bestimmt und die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **3. Ergebnisse**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Untersuchungen zur Modulation antigenspezifischer Immunantworten durchgeführt. Hierzu wurde im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung analysiert, ob die Koexpression eines immunmodulatorischen Moleküls zusammen mit einem Antigen einen Einfluss auf die Entstehung einer antigenspezifischen Immunantwort hat, bzw. ob eine bereits bestehende Immunantwort inhibiert werden kann.

In früheren Arbeiten aus diesem Labor wurde gezeigt, dass eine biolistische DNA-Immunisierung mit Plasmiden, die  $\beta$ -Galaktosidase als Modellallergen unter Kontrolle des Fascin-Promotors kodieren, in BALB/c Mäusen zur Inhibition einer Th2-Immunantwort führt [Sudowe *et al.*, 2006]. Dabei wird durch die Vakzinierung eine starke Th1-Antwort induziert, die mit einer starken IFN- $\gamma$ -Produktion durch T-Helferzellen in der Milz und den drainierenden Lymphknoten sowie einer erhöhten Produktion von antigenspezifischen IgG2a-Antikörpern im Serum der Mäuse einhergeht [Sudowe *et al.*, 2003, 2006, 2009]. Des Weiteren kommt es durch die biolistische Transfektion zur Induktion einer Th1/Tc1-vermittelten Atemwegshyperreaktivität [Zindler *et al.*, 2008].

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten biolistischen DNA-Immunisierung wird BALB/c Mäusen mit Hilfe von Heliumdruck an Goldpartikel gekoppelte Plasmid-DNA auf die rasierte Bauchhaut appliziert. Dabei werden alle Zellen der Haut direkt transfiziert. Die Verwendung des Fascin-Promotors anstelle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors ermöglicht eine Transgenexpression spezifisch nur in dermalen Dendritischen Zellen und Langerhanszellen [Ross *et al.*, 2003; Sudowe *et al.*, 2003]. Keratinozyten können aufgrund der Verwendung des DC-spezifischen Promotors das Transgen nicht exprimieren und eine Kreuzpräsentation von Antigen, das von transfizierte Keratinozyten produziert wird, bleibt somit aus [Sudowe *et al.*, 2003].

In den durchgeführten Versuchen wurde untersucht, ob eine Koapplikation von Plasmiden, die für das mit Toleranzinduktion assoziierte Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) oder für ein regulatorisches Zytokin wie IL-10 oder TGF- $\beta$  kodieren, zu einer Inhibition der durch Vakzinierung mit  $\beta$ Gal-kodierender Plasmid-DNA induzierten Th1-Immunantwort führt. Des Weiteren wurde untersucht, ob durch diese Form der DNA-Immunisierung antigenspezifische regulatorische T-Zellen entstehen, die darüber hinaus auch einen inhibierenden Effekt auf die durch Sensibilisierung mit  $\beta$ Gal-Protein induzierte Immunantwort haben und so Toleranz gegen das Modellallergen  $\beta$ Gal insgesamt induzieren.

Als Kontroll-Plasmid wurde in allen Versuchen pFascin-EGFP verwendet, da sich aufgrund der Anzahl an Basenpaaren eine vergleichbare Gesamt-Plasmidgröße wie die von pCMV-IDO, pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$  ergibt. Wenn nicht anders angegeben, wurden in den Experimenten vier Mäuse pro Gruppe immunisiert.

### **3.1 Untersuchungen des Einflusses einer biolistischen DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit IL-10 und TGF- $\beta$ kodierender Plasmid DNA auf die Entstehung einer allergenspezifischen Immunantwort**

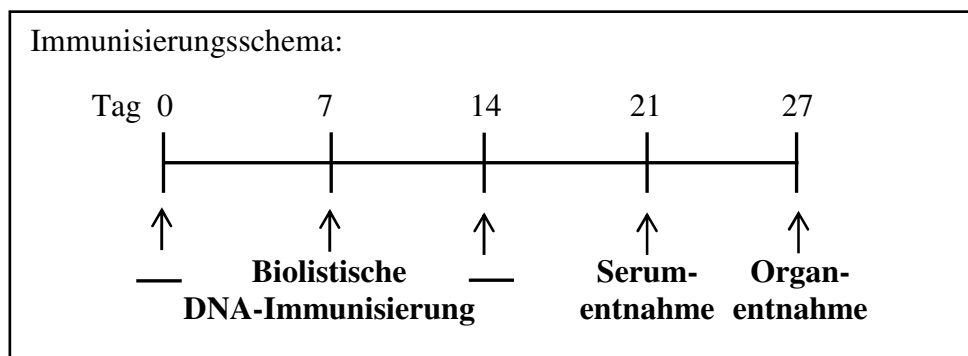
Zunächst wurde der Effekt einer Koapplikation von  $\beta$ Gal-kodierender Plasmid DNA (pFascin- $\beta$ Gal) zusammen mit IL-10 oder TGF- $\beta$  kodierender Plasmid-DNA unter Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors (pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$ ) untersucht. Der Einfluss der Koapplikation von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit DNA, die für die regulatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  kodiert wurde mit dem Einfluss einer Koapplikation von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pFascin-EGFP („enhanced green fluorescent protein“) als Kontroll-Plasmid verglichen. Die Applikation des Kontroll-Plasmids zusätzlich zu dem  $\beta$ Gal-kodierenden Plasmid sollte die gleichen Versuchsbedingungen schaffen wie eine Koapplikation zusammen mit pCMV-TGF- $\beta$  oder pCMV-IL-10. Dies soll sicherstellen, dass sich in allen Gruppen die gleiche Menge an  $\beta$ Gal und dem zweiten Plasmid auf den Goldpartikeln befindet.

Im Anschluss an die DNA-Vakzinierung wurde der antigenspezifische Immunglobulin-Titer der mit den verschiedenen Plasmid-Kombinationen immunisierten Mäuse ermittelt. Außerdem wurde die Zytokinproduktion von Milz- und Lymphknotenzellen untersucht. Des Weiteren wurden Tests zur CTL-Induktion durchgeführt, die Atemwegsreaktivität der Tiere bestimmt und die Zusammensetzung der Zellen in der bronchoalveolären Lavage nachgewiesen sowie die Menge der darin vorhandenen Zytokine bestimmt.



### 3.1.1 Effekt einer biolistischen Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal mit pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$ auf die transgenspezifische humorale Immunantwort

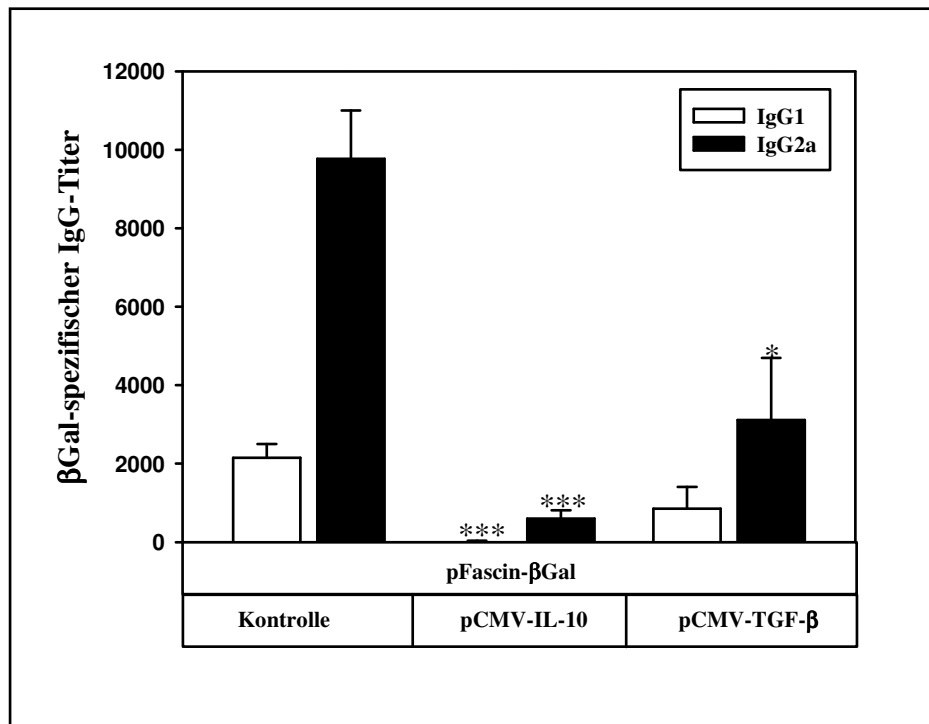
BALB/c-Mäuse wurden zunächst dreimal im Abstand von jeweils sieben Tagen mit der Genpistole immunisiert. Eine Woche später erfolgte eine Blutentnahme zum Nachweis von antigenspezifischem IgG1 und IgG2a (Abb. 1).



**Abb. 1: Immunisierungsschema für die biolistische DNA Immunisierung** BALB/c Mäuse wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit der Genpistole immunisiert. Die Immunisierung erfolgte jeweils mit 4 $\mu$ g des jeweiligen DNA-Plasmids. An Tag 21 erfolgte eine Blutentnahme zur Untersuchung der allergenspezifischen Immunglobulin-Titer im Serum. An Tag 27 wurden den Mäusen die Milz sowie die axilären und inguinalen Lymphknoten zur Bestimmung der Zytokinproduktion und der Induktion von IFN- $\gamma$ -produzierenden zytotoxischen T-Zellen entnommen.

In Abbildung 2 ist der Gehalt des  $\beta$ Gal-spezifischen IgG im Serum der immunisierten Mäuse dargestellt. Eine biolistische DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Vektor führte zu einer vermehrten Bildung von IgG2a durch die Tiere. IgG1 war vergleichsweise in geringeren Mengen nachweisbar. Das vermehrte Vorkommen von IgG2a im Vergleich zu IgG1 deutet auf die Induktion einer Th1-polarisierten Antwort hin. Die Koapplikation von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-TGF- $\beta$  führt zu einer Reduktion des  $\beta$ Gal-spezifischen IgG1 und IgG2a im Serum der Mäuse, welche im Fall des vorherrschend produzierten IgG2a auch statistische Signifikanz erreichte. Auch die Koapplikation von pCMV-IL-10 resultierte in einer deutlichen und signifikanten Reduktion der IgG-Titer, die im Vergleich sogar noch stärker ausfiel als die nach Koapplikation von pCMV-TGF- $\beta$ .

Nach einer Koimmunisierung mit pCMV-IL-10 ließen sich im Serum der Mäuse also die geringsten Mengen an  $\beta$ Gal spezifischen Antikörpern nachweisen.



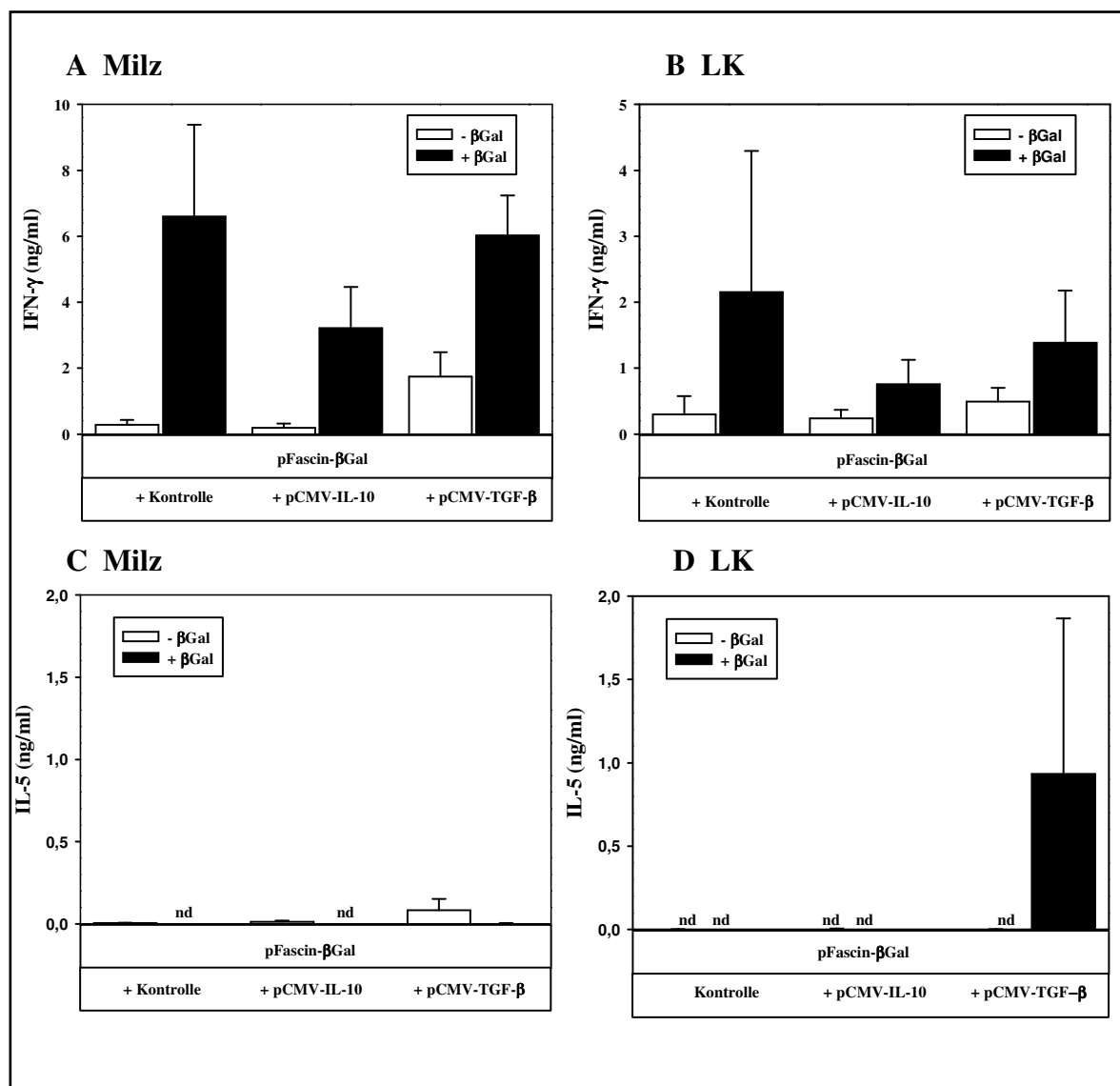
**Abb. 2: Einfluss einer Koapplikation von pFascin-βGal und pCMV-IL-10 oder pCMV-TGF-β auf die βGal-spezifische IgG-Produktion nach Immunisierung mit pFascin-βGal** BALB/c Mäuse wurden dreimal im Abstand von einer Woche mit pFascin-βGal und einem Kontroll-Plasmid (n=18) oder mit pFascin-βGal und pCMV-IL-10 (n=12) bzw. pFascin-βGal und pCMV-TGF-β (n=12) mit der Genpistole immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und der Gehalt an βGal-spezifischem IgG1 und IgG2a im Serum wurde mittel ELISA nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM der IgG-Titer individueller Seren aus drei Experimenten. Signifikante Unterschiede in der Antikörperproduktion im Vergleich zu Mäusen, die mit pFascin-βGal zusammen mit dem Kontroll-Vektor immunisiert wurden, sind mit Sternchen gekennzeichnet, (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

### 3.1.2 Effekt einer biolistischen Koimmunisierung von pFascin-βGal mit pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF-β auf die antigenspezifische Zytokinproduktion

Aus biolistisch mit den verschiedenen Plasmidkombinationen immunisierten Mäusen wurden die drainierenden Lymphknoten und die Milz entnommen und die daraus gewonnen Zellen wurden für 72 h mit βGal stimuliert. Anschließend wurde der Zytokingehalt im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt (Abb. 3). In den Kulturüberständen der mit pFascin-βGal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten Mäuse wurde sowohl in den Milz- als auch in den Lymphknotenzellkulturen eine starke antigenspezifische Produktion des Th1-Zytokins

IFN- $\gamma$  festgestellt. Die Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IL-10 führte zu einer nicht signifikanten Reduktion der antigenspezifischen IFN- $\gamma$ -Produktion sowohl in den Kulturen der stimulierten Milzzellen als auch der Lymphknotenzellen, wohingegen nach Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-TGF- $\beta$  nur in den Lymphknotenzellkulturen eine Reduktion des IFN- $\gamma$  nachweisbar war, die zudem gering ausfiel. Das Th2-spezifische Zytokin IL-5 wurde in den Kulturüberständen von Milz- und Lymphknotenzellen nur in geringer Konzentration nachgewiesen. Eine Ausnahme bilden die Lymphknotenzellüberstände der mit pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-TGF- $\beta$  immunisierten Tiere. Hier war eine erhöhte Produktion von IL-5 nachweisbar. Allerdings war hier eine sehr große Streuung der Werte innerhalb der Tiere dieser Gruppe erkennbar. Die Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid führte also zu einer Th1-polarisierten Immunantwort. Die Koimmunisierung mit pCMV-IL-10 führt zu einer Reduktion von IFN- $\gamma$ , aber im Gegenzug zu keiner Erhöhung von IL-5. Es fand also keine Verschiebung hin zu einer Th2-Immunantwort statt. Die Koapplikation von pCMV-IL-10 hatte dabei im Vergleich einen größeren Effekt in Bezug auf die Inhibition der IFN- $\gamma$ -Produktion.

Die Ergebnisse der Analyse der antigenspezifischen IgG-Produktion und des Zytokinprofils der Milz- und Lymphknotenzellen nach Restimulation weist demnach darauf hin, dass in allen drei Gruppen eine Th1-polarisierte Immunantwort vorliegt, die aber im Fall einer Koimmunisierung mit pCMV-IL-10 und pCMV-TGF- $\beta$  abgeschwächt ist.



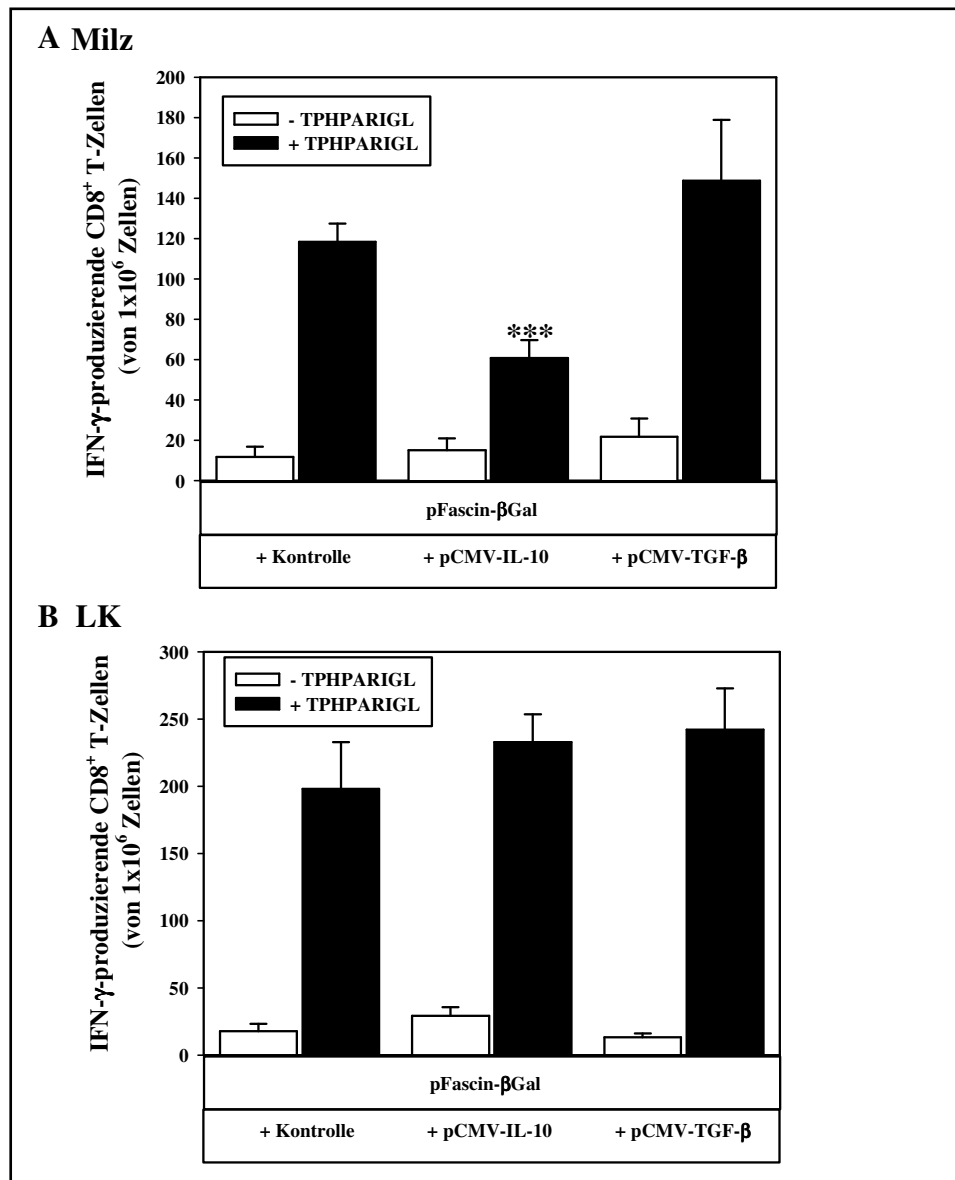
**Abb. 3: Einfluss einer Koapplikation von pFascin-βGal und pCMV-IL-10 oder pCMV-TGF-β auf die IFN-γ- und IL-5-Produktion nach Immunisierung mit pFascin-βGal nach antigenspezifischer Restimulation *in vitro*** BALB/c Mäuse (n=12) wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit pFascin-βGal + Kontroll-Plasmid, pFascin-βGal + pCMV-IL-10 oder pFascin-βGal + pCMV-TGF-β immunisiert. 13 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Milz- und drainierenden Lymphknotenzellen isoliert und in An- (schwarze Balken) bzw. Abwesenheit (weiße Balken) von 25 µg/ml βGal für 72 h kultiviert. Anschließend wurde das von den Zellen gebildete IFN-γ (**A** Milz, **B** Lymphknoten) und IL-5 (**C** Milz, **D** Lymphknoten) in den Kulturüberständen mittels ELISA nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei durchgeführten Experimenten. Die Unterschiede der Gruppen zueinander waren nicht signifikant.

### **3.1.3 Effekt einer biolistischen Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal mit pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$ auf die Induktion transgenspezifischer IFN- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen**

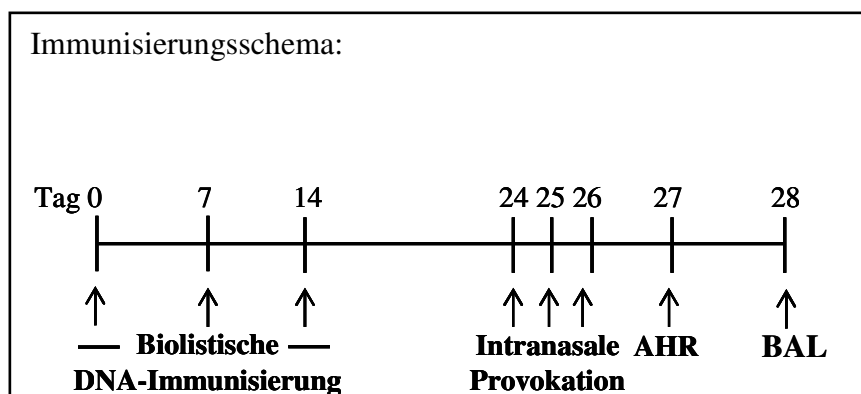
Die aus den biolistisch immunisierten Mäusen isolierten Milz- und Lymphknotenzellen wurden *ex vivo* mittels des CTL-EliSpot auf die Anwesenheit und die Frequenz antigenspezifischer IFN- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen untersucht. Eine Koimmunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid führte sowohl in der Milz und auch in den Lymphknoten zu einer potenten Induktion von CD8<sup>+</sup> antigenspezifischen IFN- $\gamma$ -produzierenden Effektor-T-Zellen. Die Frequenz dieser Zellen war nach der Koapplikation von pCMV-TGF- $\beta$  in Milz und Lymphknoten unverändert. Das gleiche Bild ergab sich bei den Lymphknoten nach Koimmunisierung mit pCMV-IL-10. In den Milzen dieser Mäuse ließ sich allerdings eine signifikante Inhibition der Induktion der CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen beobachten.

### **3.1.4 Effekt einer biolistischen Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal mit pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$ auf die Entstehung einer Atemwegshyperreaktivität**

Wie in 3.1.1 beschrieben wurden BALB/c Mäuse dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit Hilfe der Genpistole mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Vektor pFascin-EGFP, mit pCMV-IL-10 oder mit pCMV-TGF- $\beta$  immunisiert. Im Anschluss daran wurde durch intranasale Provokation mit  $\beta$ Gal an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine lokale Reaktion in den Lungen der Mäuse induziert. (Abb. 5) Als negative Kontrollgruppe dienten Mäuse, die mit Fascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Vektor immunisiert wurden und denen anschließend PBS intranasal verabreicht wurde. Einen Tag nach der letzten Provokation erfolgte eine nicht-invasive Messung der Atemwegsreaktivität in einem Ganzkörper-Plethysmographen.



**Abb.4: Einfluss einer Koapplikation von pFascin-βGal und pCMV-IL-10 oder pCMV-TGF-β auf die Induktion IFN-γ-produzierender CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen** BALB/c Mäuse (n=12) wurden dreimal im Abstand von einer Woche, mit Hilfe der Genpistole, mit pFascin-βGal zusammen mit einem Kontroll-Plasmid, pCMV-IL-10 oder pCMV-TGF-β immunisiert. 13 Tage nach der letzten Immunisierung wurden Milz- (A) und drainierende Lymphknotenzellen (B) isoliert und die Anzahl der IFN-γ produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde mittels des CTL-EliSpot ermittelt. Dazu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in An- (schwarze Balken) bzw. Abwesenheit (weiße Balken) des βGal-spezifischen Peptids TPHPARIGL kultiviert. Nach 20 Stunden erfolgte die Auswertung des Tests. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei Experimenten. Signifikante Unterschiede der Induktion zytotoxischer T-Zellen von mit pFascin-βGal + pCMV-IL-10 immunisierten Tieren im Vergleich zu Mäusen, die mit pFascin-β + Kontrolle immunisiert wurden, sind gekennzeichnet, (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ). Die Unterschiede der mit pFascin-βGal + pCMV-TGF-β immunisierten Mäuse und der mit dem Kontroll-Plasmid immunisierten Tiere waren nicht signifikant.

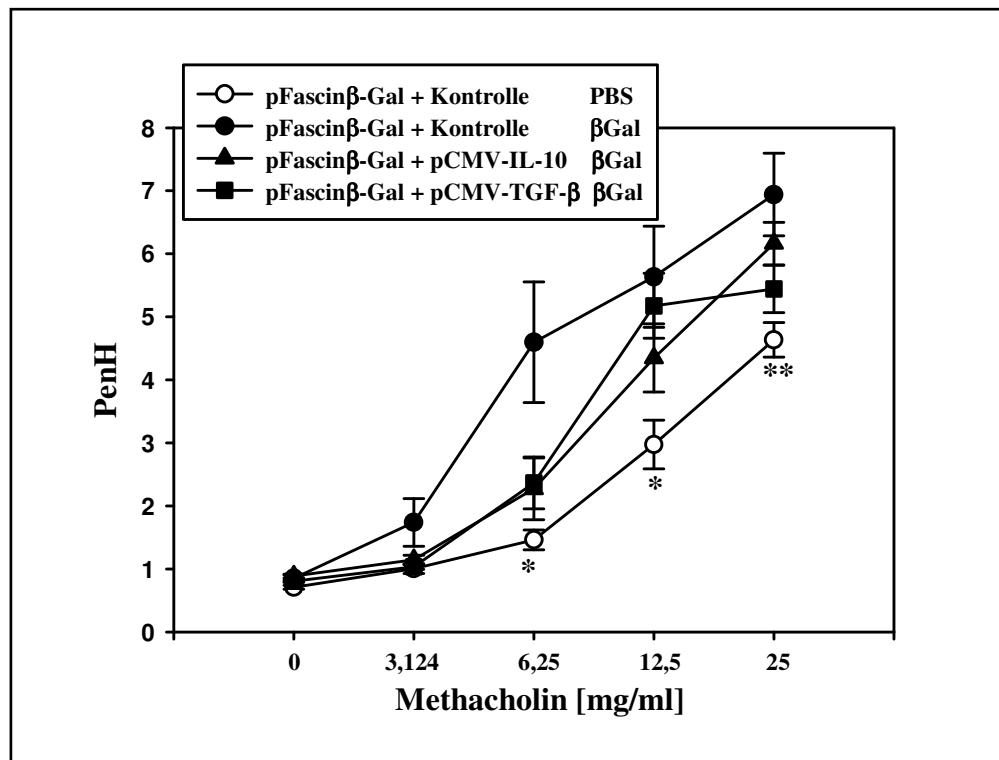


**Abb.5: Immunisierungsschema für die biolistische DNA Immunisierung** BALB/c Mäuse wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit der Genpistole immunisiert. Die Immunisierung erfolgte jeweils mit insgesamt 4µg der jeweiligen DNA-Plasmid-Kombination. An Tag 24, 25 und 26 erfolgte eine Provokation der Tiere der Versuchsgruppen durch intranasale Gabe von 50 µg βGal bzw. die Applikation von PBS in einer Kontrollgruppe zur Bestimmung der Grundaktivität. Am Tag 27 wurde die Atemwegshyperreaktivität (AHR) nicht-invasiv in einem Ganzkörper-Pletysmographen bestimmt. Am Tag 28 nach der ersten Immunisierung wurde eine Lungenspülung durchgeführt.

In Abbildung 6 sind die Ergebnisse der Lungenfunktionsmessung dargestellt. Hierbei sind die zur Provokation verwendete Methacholindosis und der jeweilige gemessene PenH-Wert graphisch dargestellt. Bei den vakzinierten mit PBS behandelten Mäusen konnte nach Provokation mit βGal nur ein geringer Anstieg der Atemwegsreaktivität gemessen werden. Im Vergleich dazu wiesen die mit pFascin-βGal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten und anschließend mit βGal provozierten Mäuse eine deutliche Atemwegshyperreaktivität auf. Die Werte der mit PBS behandelten Kontrollmäusen lagen signifikant darunter.

Eine Koexpression von pFascin-βGal mit pCVM-IL-10 und auch mit βCMV-TGF-β führte zu einer abgeschwächten Atemwegshyperreaktivität im Vergleich zu der mit βGal behandelten Kontrollgruppe. Die gemessenen PenH-Werte lagen hierbei zwischen denen der positiven und der negativen Kontrollgruppe.

Einhergehend mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen einer Reduktion der antigenspezifischen IgG-Produktion und einer verringerten Zytokinproduktion nach der Koimmunisierung mit pCMV-IL-10 und pCMV-TGF-β ist somit die Atemwegshyperreaktivität nach intranasaler Provokation mit βGal im Vergleich zu den mit dem pFascin-βGal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten Kontrolltieren inhibiert.



**Abb.6: Einfluss einer Koapplikation von pFascin-βGal und pCMV-IL-10 oder pCMV-TGF-β auf die Entwicklung einer Atemwegshyperreaktivität nach intranasaler Provokation mit βGal** BALB/c-Mäuse (n=11) wurden mit pFascin-βGal und pFascin-EGFP, pCMV-IL-10 oder pCMV-TGF-β mit Hilfe der Genpistole immunisiert und im Anschluss daran dreimal im Abstand von 24 h mit βGal intranasal provoziert. Kontrolltiere wurden mit PBS behandelt. Im Anschluss daran wurde eine nicht-invasive Messung der Atemwegshyperreaktivität im Ganzkörper-Plethysmographen durchgeführt. Dabei wird bei steigender Methacholin-Dosis (3,125, 6,25, 12,5, 25 mg/ml) die Lungenfunktion gemessen. In der Graphik ist der gemessene PenH-Wert als Maß für die Atemwegsreaktivität abgebildet. Als Vergleichswert für einen Anstieg der Atemwegsreaktivität dient der PenH-Wert ohne Gabe von Methacholin. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 11 Mäusen. Signifikante Unterschiede der PenH-Werte von Mäusen, die mit pFascin-βGal + Kontrolle immunisiert und mit PBS intranasal behandelt wurden (weiße Kreise) im Vergleich zu Tieren, die mit den gleichen Plasmiden immunisiert und mit βGal provoziert wurden (schwarze Kreise), sind gekennzeichnet (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ). Die Unterschiede der PenH-Werte für die Tiere, die mit Fascin-βGal + pCMV-IL-10 (schwarze Dreiecke) bzw. pFascin-βGal + pCMV-TGF-β (schwarze Vierecke) immunisierten wurden, und den mit dem Kontroll-Plasmid und pFascin-βGal koimmunisierten Mäusen waren statistisch nicht signifikant.



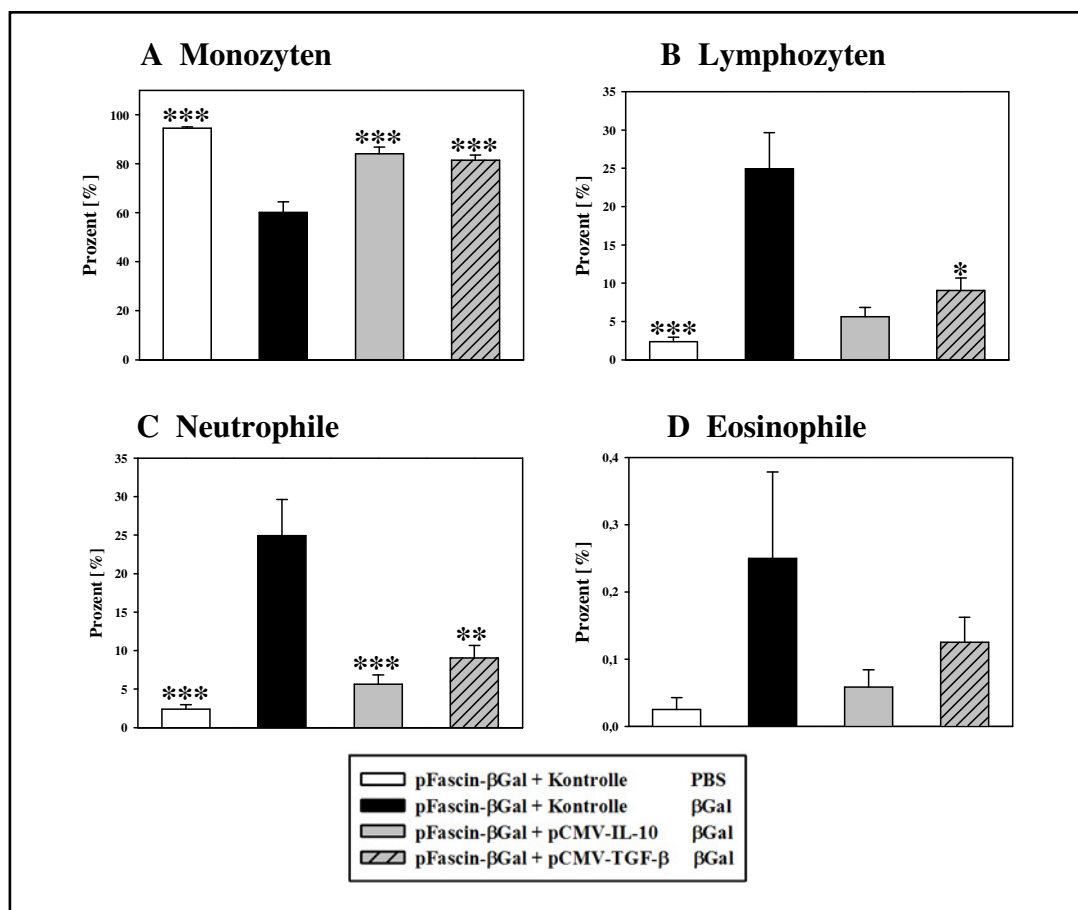
### **3.1.5 Effekt einer biolistischen Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal mit pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$ auf die zelluläre Zusammensetzung in der bronchoalveolären Flüssigkeit**

Nach der Messung der Atemwegsreaktivität wurde bei den Mäusen einen Tag später eine Lungenspülung, eine sogenannte bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt. Im Anschluss wurden nach Zentrifugation die Überstände von den Zellen getrennt und sofort bis zur weiteren Analyse weggefroren, um einen enzymatischen Abbau von Zytokinen zu verhindern. Die zelluläre Zusammensetzung der BAL wurde nach der Anfertigung von Zytospin-Präparaten analysiert. Dazu wurden die verschiedenen Zellen mit Hilfe einer Diff-Quick<sup>®</sup>-Färbung angefärbt, so dass die unterschiedlichen Zellarten mikroskopisch aufgrund der Morphologie und des charakteristischen Färbeverhaltens unterschieden werden konnten (Abb.7). Eine Bestimmung des Th2-Zytokins IL-5 und des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$  in den Überständen der Lungenspülung erfolgte mittels ELISA (Abb.8).

In den mit PBS behandelten Kontrolltieren waren die am häufigsten in der bronchoalveolären Lavage vorkommenden Zellen Monozyten. Alle anderen Zelltypen waren nur zu einem sehr geringen prozentualen Anteil vorhanden. Eine intranasale Provokation mit  $\beta$ Gal führte im Vergleich dazu zu einer deutlich signifikanten Erhöhung des Anteils an Neutrophilen und Lymphozyten in der Lunge. Bei den negativen Kontrolltieren lag der Anteil an Lymphozyten in etwa bei  $8 \times 10^3$  und es konnten im Mittel  $4,5 \times 10^3$  Neutrophile nachgewiesen werden. Nach intranasaler Applikation von  $\beta$ Gal stieg die Anzahl an Lymphozyten auf etwa  $5,6 \times 10^4$  und die der Neutrophilen auf  $9 \times 10^4$  Zellen. Der Anteil an Eosinophilen war nach Provokation mit  $\beta$ Gal leicht erhöht. Durch die Koimmunisierung mit pCMV-IL-10 und pCMV-TGF- $\beta$  kam es zu einer deutlichen, teils signifikanten Inhibition der durch die Provokation erhöhten Frequenz an Neutrophilen und Lymphozyten in der Lunge. In diesen Tieren waren, wie auch bei der Negativkontrolle, Monozyten der vorherrschende Zelltyp.

Einhergehend mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen der Reduktion der Atemwegshyperreaktivität nach Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$  kommt es also zu einem signifikant geringeren prozentualen Anteil an allergeninduzierten neutrophilen Granulozyten, nach intranasaler Provokation mit  $\beta$ Gal, im Vergleich zu den mit dem pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten und mit  $\beta$ Gal behandelten Kontrolltieren.

Die nach Immunisierung mit pFascin $\beta$ Gal und anschließender Provokation induzierte Atemwegshyperreaktivität und der Einstrom neutrophiler Granulozyten in die Lunge können also durch eine Koapplikation von pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$  inhibiert werden.



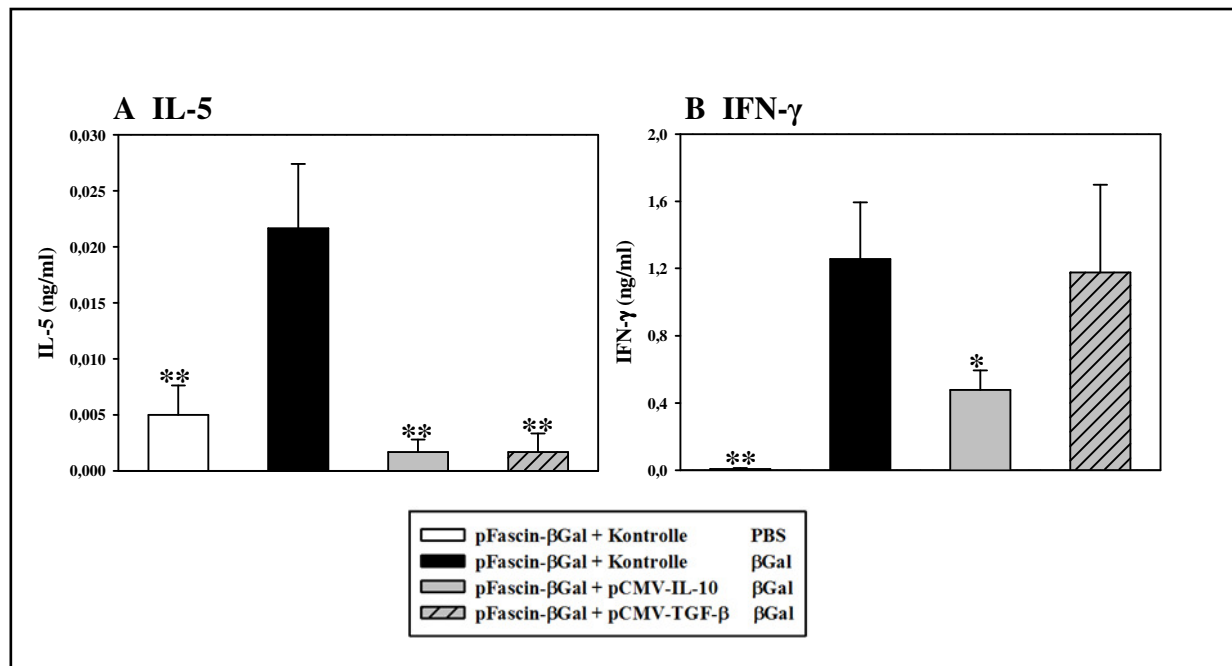
**Abb. 7:** Einfluss einer Koapplikation von pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IL-10 oder pCMV-TGF- $\beta$  auf die zelluläre Zusammensetzung der BAL BALB/c-Mäuse (n=12) wurden mit pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-IL-10 (graue Balken), pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-TGF- $\beta$  (grau schraffierte Balken) oder pFascin- $\beta$ Gal + Kontroll-Plasmid immunisiert und anschließend mit  $\beta$ Gal provoziert (schwarze Balken) bzw. mit PBS zur Kontrolle behandelt (weiße Balken). Zwei Tage nach der letzten Provokation wurde eine Spülung der Lungen durchgeführt. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Zytospin-Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht, einer Diff-Quick®-Färbung unterzogen und anschließend mikroskopisch anhand der Morphologie und des Färbeverhaltens charakterisiert und ausgezählt. Hierbei wurden Monozyten (A), Lymphozyten (B), Neutrophile (C) und Eosinophile (D) unterschieden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei Experimenten. Signifikante Unterschiede der prozentualen Anteile an Zellen nach Immunisierung im Vergleich zu Tieren, die mit pFascin- $\beta$ Gal + Kontrolle immunisiert und mit  $\beta$ Gal provoziert wurden, sind gekennzeichnet (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

In Abbildung 8 sind die im Überstand der bronchoalveolären Lavage gemessenen Zytokine dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte dreier Experimente mit je vier Mäusen. Das Th1-

Zytokin IFN- $\gamma$  war nach der biolistischen Immunisierung und einer Provokation mit  $\beta$ Gal in erhöhten Konzentrationen nachweisbar. Dies lässt auf die lokale Induktion einer Th1-Antwort schließen. In den BAL-Überständen der negativen Kontrolltiere war die IFN- $\gamma$ -Menge sehr gering. Nach der Koapplikation von pFascin- $\beta$ Gal mit pFascin-EGFP und von einer intranasalen Provokation mit  $\beta$ Gal wurde die größte Menge an IFN- $\gamma$  gemessen. Es kam also zu einer Induktion der IFN- $\gamma$ -Produktion durch die Applikation von  $\beta$ Gal. Die Koapplikation von TGF- $\beta$  hatte keinen inhibierenden Effekt auf die  $\beta$ Gal-induzierte Zytokinproduktion in der Lunge. Diese war allerdings signifikant vermindert nach Koimmunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IL10 verglichen mit den intranasal provozierten Kontrollmäusen.

Das Th2-Zytokin IL-5 wurde in allen gemessenen Überständen nur in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen. Die höchste Konzentration wurde in der BAL-Flüssigkeit der mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten, und mit  $\beta$ Gal provozierten Tieren detektiert. Sowohl in der negativen Kontrollgruppe als auch in den mit einer Kombination von pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$  immunisierten Mäusen war die Konzentration an IL-5 signifikant inhibiert im Vergleich zur Positivkontrolle.

Somit führt die biolistische DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Vektor zu einer durch Th1-Zellen vermittelten Immunantwort, die durch eine gesteigerte IFN- $\gamma$ -Produktion in der Milz, in den Lymphknoten und in der Lunge charakterisiert ist. Des Weiteren kommt es zur Induktion einer Atemwegshyperreaktivität, die von einer Einwanderung von Neutrophilen in die Lunge begleitet wird. Eine Kovakzinierung mit pCMV-IL-10 und, allerdings in geringerem Ausmaß, auch mit pCMV-TGF- $\beta$  führt zu einer Verminderung der IFN- $\gamma$ -Produktion, zu einer verminderten Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge und damit einhergehend auch zu einer Inhibition der Atemwegshyperreaktivität.



**Abb. 8: Einfluss einer Koapplikation von pFascin-βGal und pCMV-IL-10 oder pCMV-TGF-β auf die IFN-γ- und IL-5-Produktion in der Lunge nach intranasaler Provokation mit βGal BALB/c Mäuse (n=12)** wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit pFascin-βGal + Kontroll-Plasmid (schwarze Balken: positive Kontroll-Gruppe, weiße Balken: negative Kontroll-Gruppe), pFascin-βGal + pCMV-IL-10 (graue Balken) oder pFascin-βGal + pCMV-TGF-β (grau schraffierte Balken) mit der Genpistole immunisiert und im Anschluss daran, ab Tag 24 dreimal im Abstand von 24 h mit βGal intranasal provoziert, bzw. zur Kontrolle mit PBS behandelt. An Tag 28 wurden die Lungen der Tiere gespült und anschließend das von den Zellen in der Lunge gebildete IL-5 (A) und IFN-γ (B) in den Überständen der bronchoalveolären Lavage mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von drei durchgeführten Experimenten. Signifikante Unterschiede der nachgewiesenen Zytokin-Konzentrationen im Vergleich zu Tieren, die mit pFascin-βGal + Kontrolle immunisiert und mit βGal provoziert wurden sind gekennzeichnet (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ).

### 3.2 Untersuchungen des Einflusses einer biolistischen Koimmunisierung mit pFascin-βGal und IL-10- bzw. TGF-β-kodierender Plasmid DNA im Mausmodell der antigeninduzierten Atemwegsentzündung

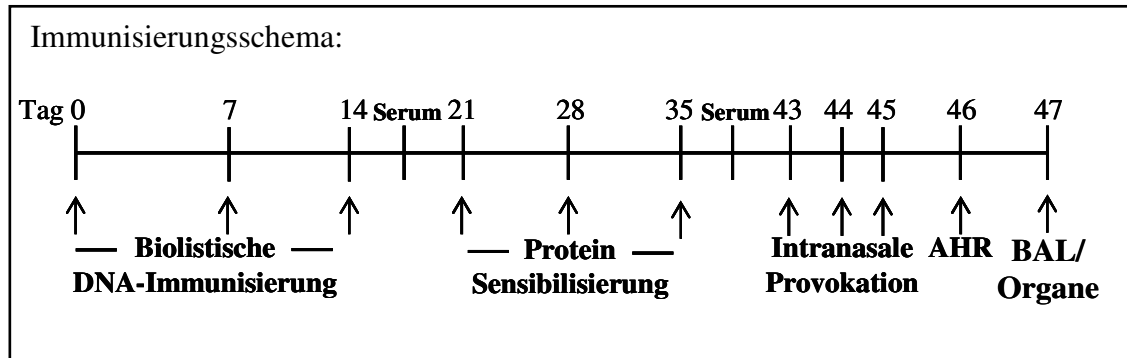
Als nächstes wurde untersucht, ob eine prophylaktische Koapplikation von βGal-kodierender Plasmid DNA zusammen mit IL-10 oder TGF-β kodierender DNA unter Kontrolle des CMV-

Promotors einen Effekt auf eine nachfolgende Proteinsensibilisierung hat. In früheren Arbeiten aus der Klinischen Forschergruppe Allergie [Ludwig-Portugall *et al.*, 2004] wurde gezeigt, dass eine genetische Immunisierung mit antigenkodierender Plasmid-DNA zu einer Inhibition der allergenspezifischen IgE- und IgG1-Produktion, die durch nachfolgende Proteinsensibilisierung induziert wird, führt. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob durch eine Koimmunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$  regulatorische T-Zellen rekrutiert werden, die den Effekt der nachfolgenden Proteinsensibilisierung verstärkt inhibieren können.

Dazu wurden BALB/c Mäuse eine Woche nach der letzten DNA-Vakzinierung dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit  $\beta$ Gal Protein subkutan immunisiert (Abb. 9). Im Anschluss daran wurden die antigenspezifischen Immunglobulin-Titer der mit den verschiedenen Plasmid-Kombinationen immunisierten und anschließend sensibilisierten Mäuse ermittelt. Des Weiteren wurde die Zytokin-Produktion von Milz- und Lymphknotenzellen untersucht, die Frequenz der CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen in der Lunge wurde bestimmt, die Atemwegsreaktivität ermittelt und die Zusammensetzung der Zellen in der Bronchoalveolären Lavage untersucht.

### **3.2.1 Effekt einer prophylaktischen Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$ auf die IgG-Produktion**

BALB/c-Mäuse wurden zunächst dreimal im Abstand von jeweils 7 Tagen mit der Genpistole immunisiert und die erfolgreiche DNA-Immunisierung anhand der antigenspezifischen IgG-Produktion im Serum der Mäuse ermittelt. Anschließend erfolgte eine dreimalige Proteinsensibilisierung im Abstand von jeweils einer Woche. Im Anschluss daran erfolgte eine Blutentnahme zum Nachweis von antigenspezifischem IgG1 und IgG2a zur Überprüfung des Einflusses der biolistischen Immunisierung auf die Immunglobulin-Produktion (Abb. 9).



**Abb. 9: Immunisierungsschema für die prophylaktische biolistische DNA Immunisierung im Mausmodell der antigeninduzierten Atemwegsentzündung.** BALB/c Mäuse wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit der Genpistole immunisiert. Die Immunisierung erfolgte jeweils mit insgesamt 4µg der jeweiligen DNA-Plasmid-Kombination. Anschließend erfolgte eine Blutentnahme zur Überprüfung der antigenspezifischen Immunglobulin-Titer im Serum. Ab Tag 21 wurden die Mäuse dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit 10µg βGal in 200 µl 1xPBS subkutan in die Nackenfalte immunisiert und anschließend Serum zur erneuten Bestimmung des antigenspezifischen Immunglobulin-Titers entnommen. An Tag 43, 44 und 45 erfolgte jeweils eine intranasale Provokation mit 50 µg βGal in 50 µl 1xPBS. Am Tag 46 wurde die Atemwegshyperreaktivität nicht-invasiv in einem Ganzkörper-Plethysmographen bestimmt. Einen Tag darauf wurde eine Lungenspülung durchgeführt und die Milz und die bronchialen und mediastinalen Lymphknoten zum Nachweis der Zytokin-Produktion bzw. die Lunge zur Bestimmung der Frequenz der IFN-γ-produzierenden CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen entnommen.

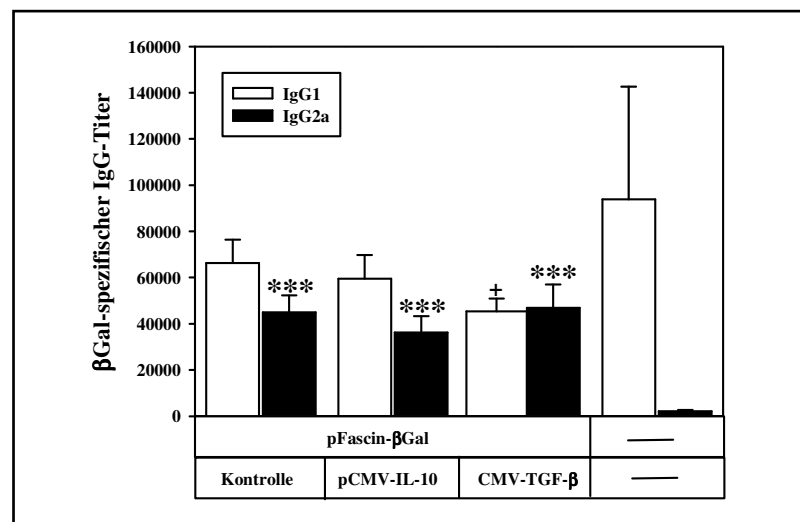
Wie in Abbildung 2 gezeigt worden war führt eine biolistische DNA-Immunisierung mit pFascin-βGal zu einer vermehrten Bildung von IgG2a, wohingegen IgG1 nur in geringeren Mengen im Serum nachgewiesen werden kann. Eine Koapplikation von pFascin-βGal zusammen mit CMV-TGF-β bzw. pCMV-IL-10 führte zu einer Reduktion von IgG1 und IgG2a im Serum der Mäuse.

Nach der nachgeschalteten Proteinsensibilisierung wurde eine insgesamt wesentlich höhere IgG-Produktion gemessen als vor dem Beginn der Immunisierung mit dem Protein. Die antigenspezifische Antikörperproduktion nach der Proteinsensibilisierung ohne vorherige Vakzinierung wird durch die Synthese von IgG1 dominiert (Abb. 10). In den Tieren, die zuvor mit pFascin-βGal in Kombination mit dem Kontroll-Plasmid vakziniert wurden ist, verglichen damit, weniger IgG1 und viel mehr IgG2a nachweisbar. Dies liefert einen Hinweis auf eine Umorientierung der Immunantwort.

Eine Koimmunisierung mit pCMV-IL-10 hat verglichen mit den Mäusen, die mit pFascin-βGal und der Kontrolle immunisiert wurden, keinen weiteren Einfluss auf die

antigenspezifische IgG-Produktion. Lediglich nach der Koimmunisierung mit pCMV-TGF $\beta$  konnte, verglichen mit den mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit dem Kontroll-Plasmid immunisierten Tieren, eine signifikante Reduktion der IgG1-Produktion nachgewiesen werden.

Eine Proteinsensibilisierung alleine führt also zu einem vermehrten Vorkommen von IgG1 im Serum, was auf das Vorhandensein einer Th2-Immunantwort hinweist. Eine biolistische DNA-Immunisierung vor der Proteinsensibilisierung führt zur Produktion von sowohl IgG1 als auch IgG2a im Serum der Mäuse. IgE wurde im Serum der Mäuse auch bestimmt. Der Titer in den sensibilisierten Kontrollen war allerdings zu gering, um Aussagen zur Inhibition der IgE-Produktion durch die Vakzinierung machen zu können.



**Abb. 10: Einfluss einer prophylaktischen DNA-Immunisierung auf die IgG-Produktion im Mausmodell der antigeninduzierten Atemwegsentzündung** BALB/c Mäuse (n=16) wurden dreimal im Abstand von einer Woche mit pFascin- $\beta$ Gal und einem Kontroll-Plasmid, pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-IL-10 oder pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-TGF- $\beta$  mit der Genpistole immunisiert. Anschließend wurden die Mäuse dreimal im Abstand von einer Woche mit 10  $\mu$ g  $\beta$ Gal subkutan in die Nackenfalte immunisiert. Als Kontrolle dienten Tiere, die nur mit dem Protein sensibilisiert wurden. Vier bis fünf Tage nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und das  $\beta$ Gal-spezifische IgG1 und IgG2a im Serum wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der IgG-Titer individueller Seren. Signifikante Unterschiede der Antikörperproduktion von biolistisch immunisierten Tieren im Vergleich zu Mäusen, die mit dem Protein sensibilisiert wurden sind gekennzeichnet, (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ). Signifikante Unterschiede der mit pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-IL-10/TGF- $\beta$  immunisierten Tiere im Vergleich zu den mit pFascin- $\beta$ Gal + Kontrolle immunisierten Tiere sind gekennzeichnet(+)  $p \leq 0,05$ ).

### **3.2.2 Effekt einer prophylaktischen Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$ auf die Zytokinproduktion**

Aus vakzinieren und sensibilisierten Mäusen (siehe Abb. 9) wurden nach der intranasalen Provokation die bronchialen und mediastinalen Lymphknoten und die Milz entnommen. Die daraus gewonnenen Zellen wurden in Kultur genommen und für 72 h mit  $\beta$ Gal stimuliert. Anschließend wurden die durch die Zellen produzierten Zytokine im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt und mit der Zytokin-Produktion unstimulierter Zellen verglichen (Abb. 11).

In den Kulturüberständen der Milz- und Lymphknotenzellen von Kontrollmäusen, die mit Protein sensibilisiert und abschließend mit PBS intranasal behandelt wurden war, entgegen den Erwartungen, die höchste antigenspezifische Produktion des Th1 Zytokins IFN- $\gamma$  nachweisbar. In den positiven proteinsensibilisierten Kontrolltieren hingegen war nur eine geringe Menge an sezerniertem IFN- $\gamma$  in den Milz- und Lymphknoten-Überständen nachweisbar. Diese war vergleichbar mit der IFN- $\gamma$ -Konzentration der Tiere, die zuvor mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisiert wurden. Das gleiche Bild ergab sich für eine Koimmunisierung von pFascin $\beta$ Gal mit pCMV-TGF- $\beta$ . Lediglich nach einer Koimmunisierung mit pCMV-IL-10 konnte in den Kulturüberständen stimulierter Milzzellen eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion nachgewiesen werden. Das Th2-spezifische Zytokin IL-5 konnte in den Kulturüberständen der Milzzellen in allen Gruppen in vergleichbaren Konzentrationen nachgewiesen werden. Nur in Milzzell-Überständen von mit pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$  Koimmunisierten Tieren konnte, verglichen mit den proteinsensibilisierten Kontrolltieren, eine moderat verminderte IL-5-Produktion nachgewiesen werden. In den Lymphknoten konnte die geringste Konzentration an IL-5 in der negativen Kontrollgruppe nachgewiesen werden. In den Überständen der proteinsensibilisierten Positivkontrolle hingegen konnte eine gesteigerte IL-5-Produktion nachgewiesen werden. Diese wurde durch die biolistische DNA-Immunisierung in allen Gruppen moderat vermindert.

Eine Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit einem Kontroll-Plasmid, und auch eine Koimmunisierung mit pCMV-IL-10 und pCMV-TGF- $\beta$ , gefolgt von einer Proteinsensibilisierung führt demnach nicht mehr zu einer reinen Th1-Immunantwort. Es konnten auch große Mengen des Th2 Zytokins IL-5 nachgewiesen werden. Hierbei hat eine vorausgegangene DNA-Immunisierung keinen inhibierenden Effekt auf die Zytokin-Produktion.



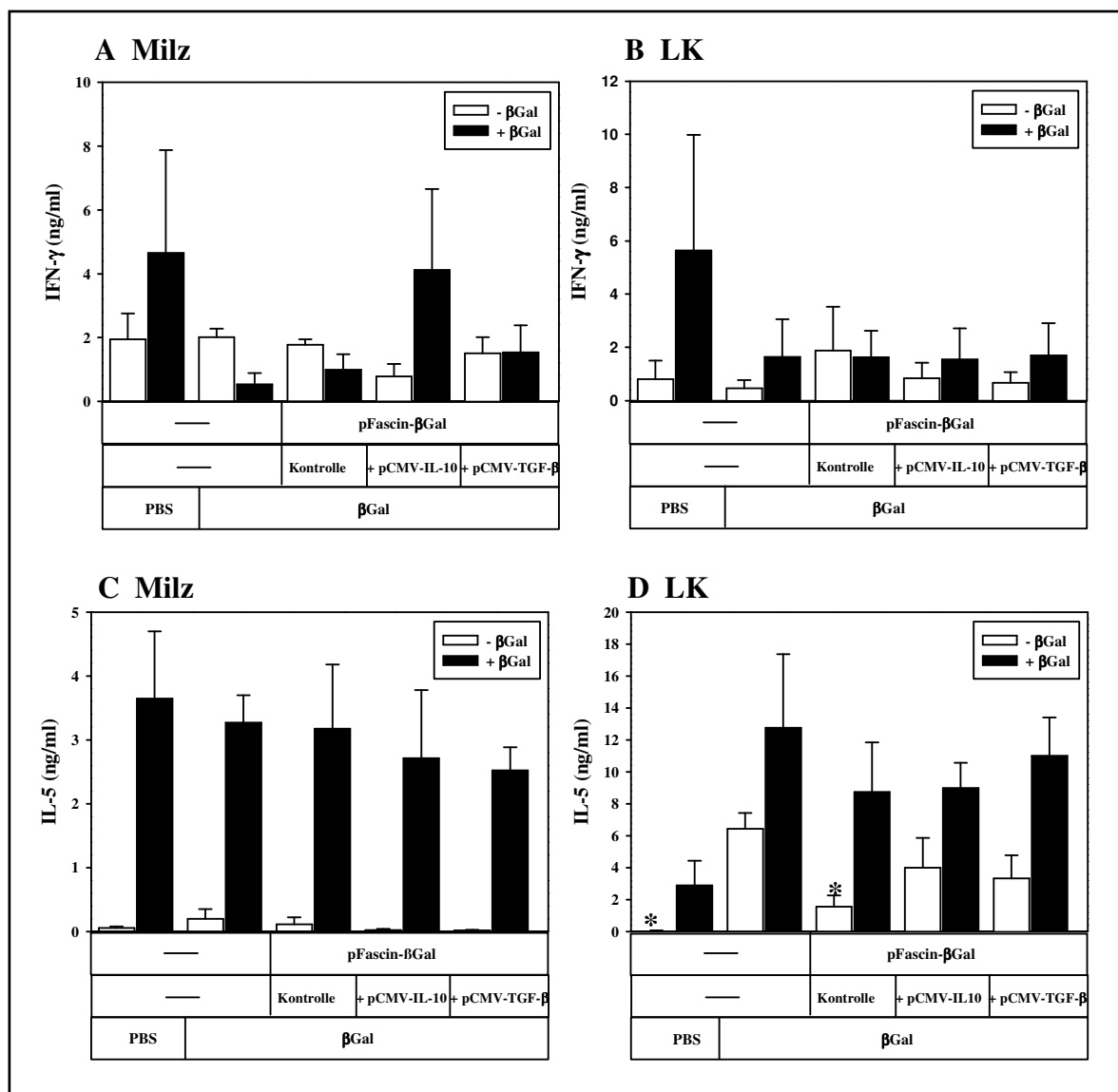
Die Analyse des Zytokin-Profiles nach Restimulation zusammen mit den in 3.2.1 beschriebenen Ergebnissen des Nachweises der antigenspezifischen IgG-Produktion zeigen also, dass die DNA-Immunisierung einen Einfluss auf die durch die Proteinsensibilisierung induzierte Th2-Antwort hat. Sie ist allerdings nicht in der Lage diese komplett zu inhibieren.

### **3.2.3 Effekt einer prophylaktischen Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$ auf die im Mausmodell der antigeninduzierten Atemwegsentzündung hervorgerufene Atemwegshyperreaktivität**

Die immunisierten und sensibilisierten Mäuse wurden, nachdem sie mit  $\beta$ Gal intranasal provoziert wurden, auf die lokalen Reaktionen in der Lunge hin untersucht.

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Messung der Atemwegsreaktivität dargestellt. Die gemessenen PenH-Werte bei den unterschiedlichen zur Provokation verwendeten Methacholin-Dosen sind hierbei graphisch dargestellt. Die negativen mit PBS behandelten Kontrolltiere zeigen nur eine geringfügige Erhöhung der gemessenen PenH-Werte nach Provokation mit Methacholin. Die mit dem  $\beta$ Gal Protein sensibilisierten und mit  $\beta$ Gal intranasal provozierten Tiere zeigen hingegen eine mit steigenden Methacholin-Dosen zunehmende Atemwegshyperreaktivität.

Eine vor die Proteinsensibilisierung geschaltete Koimmunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit einem Kontroll-Plasmid führte zu einer Reduktion der AHR im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe, die allerdings nur bei einer Dosis von 3,125 mg/ml signifikant war.



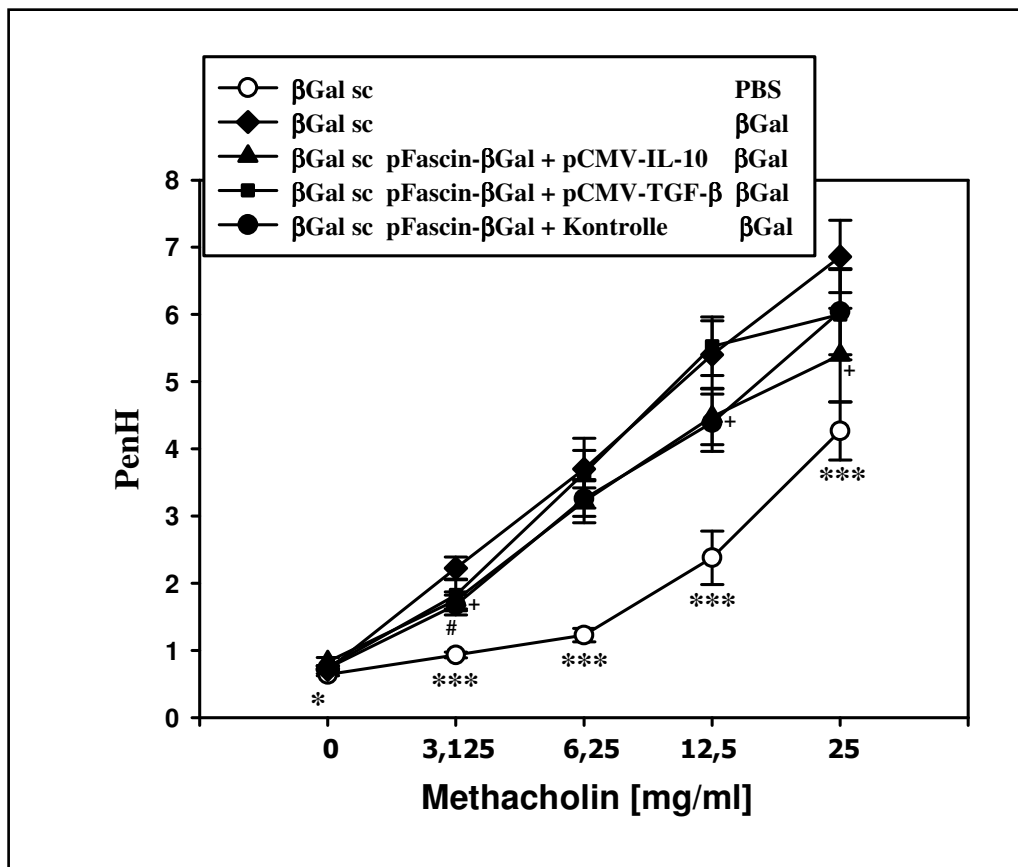
**Abb. 11 Einfluss einer protektiven DNA-Immunisierung auf die IFN- $\gamma$ - und IL-5-Produktion im Mausmodell der antigeninduzierten Atemwegsentzündung** BALB/c Mäuse (n=16) wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit pFascin- $\beta$ Gal + Kontroll-Plasmid, pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-IL-10 oder pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-TGF- $\beta$  immunisiert und im Anschluss daran dreimal im Abstand von einer Woche mit 10  $\mu$ g  $\beta$ Gal-Protein sensibilisiert. Danach wurden die Mäuse durch eine dreimalige Gabe von  $\beta$ Gal intranasal provoziert. Als Kontrolle wurden weitere Mäuse nur mit  $\beta$ Gal sensibilisiert und anschließend intranasal mit PBS bzw.  $\beta$ Gal behandelt. Zwei Tage nach der letzten Provokation wurden Milz- und Lymphknotenzellen isoliert und in An- (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 25  $\mu$ g/ml  $\beta$ Gal für 72 h kultiviert. Anschließend wurde das von den Zellen gebildete IFN- $\gamma$  (A Milz, B Lymphknoten) und IL-5 (C Milz, D Lymphknoten) in den Kulturüberständen mittels ELISA nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier durchgeführten Experimenten. Signifikante Unterschiede der nur mit Protein sensibilisierten und mit  $\beta$ Gal provozierten Tiere im Vergleich zu den mit PBS behandelten und denen, die zuvor mit der Genpistole immunisiert wurden sind gekennzeichnet (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ ). Die Unterschiede der mit pCMV-IL-10 und pCMV-TGF- $\beta$  immunisierten Tiere im Vergleich zu der mit  $\beta$ Gal immunisierten Positivkontrolle waren nicht signifikant.

Eine Koimmunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-TGF- $\beta$  führte nur bei einer Dosis von 3,125 und 25 mg/ml zu einer moderaten nicht signifikanten Reduktion der Atemwegsreaktivität im Vergleich zu der Protein behandelten positiven Kontrollgruppe. Allerdings lagen die gemessenen Werte dieser Tiere im Mittel über denen der Tiere, die mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Vektor behandelt wurden. Eine Koexpression von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IL-10 führt zu einer Reduktion der Atemwegsreaktivität im Vergleich zur Positivkontrolle und zu mit pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-TGF- $\beta$  immunisierten Tieren. Diese war bezogen auf die proteinsensibilisierten mit  $\beta$ Gal provozierten Tiere bei Methacholin-Dosen von 3,125, 12,5 und 25 mg/ml signifikant. Im Vergleich zu einer Koimmunisierung mit dem Kontroll-Plasmid führte eine Koapplikation von pCMV-IL-10 allerdings nur bei einer Dosis von 25 mg/ml Methacholin zu einer moderaten Reduktion der Atemwegsreaktivität. Eine DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-TGF- $\beta$  führte nicht zu einer solch signifikanten Reduktion der Atemwegsreaktivität. Bei Methacholin-Dosen von 3,125 und 25 mg/ml war eine Reduktion der Atemwegshyperreaktivität im gleichen Maße wie nach Koimmunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid zu beobachten. Bei einer Dosis von 6,25 und 12,5 mg/ml lag das Mittel der gemessenen PenH-Werte aller Tiere in etwa so hoch wie das der Positivkontrolle.

Es konnte also trotz einer ähnlichen antigen-spezifischen IgG-Produktion und einem vergleichbaren Zytokin-Profil eine größere Reduktion der Atemwegshyperreaktivität gemessen werden, wenn zuvor mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IL-10 oder dem Kontroll-Plasmid immunisiert wurde.

#### **3.2.4 Effekt einer prophylaktischen Immunisierung mit pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$ auf die im Mausmodell der antigeninduzierten Atemwegsentszündung hervorgerufene Eosinophilie in der Lunge**

Einen Tag nach der Messung der Atemwegsreaktivität wurde bei den Mäusen eine Lungenspülung durchgeführt und die zelluläre Zusammensetzung der BAL analysiert (Abb.13). Des Weiteren erfolgte ein Nachweis des Th2 Zytokins IL-5 und des Th1 Zytokins IFN- $\gamma$  in den Überständen der Lungenspülung (Abb.14).

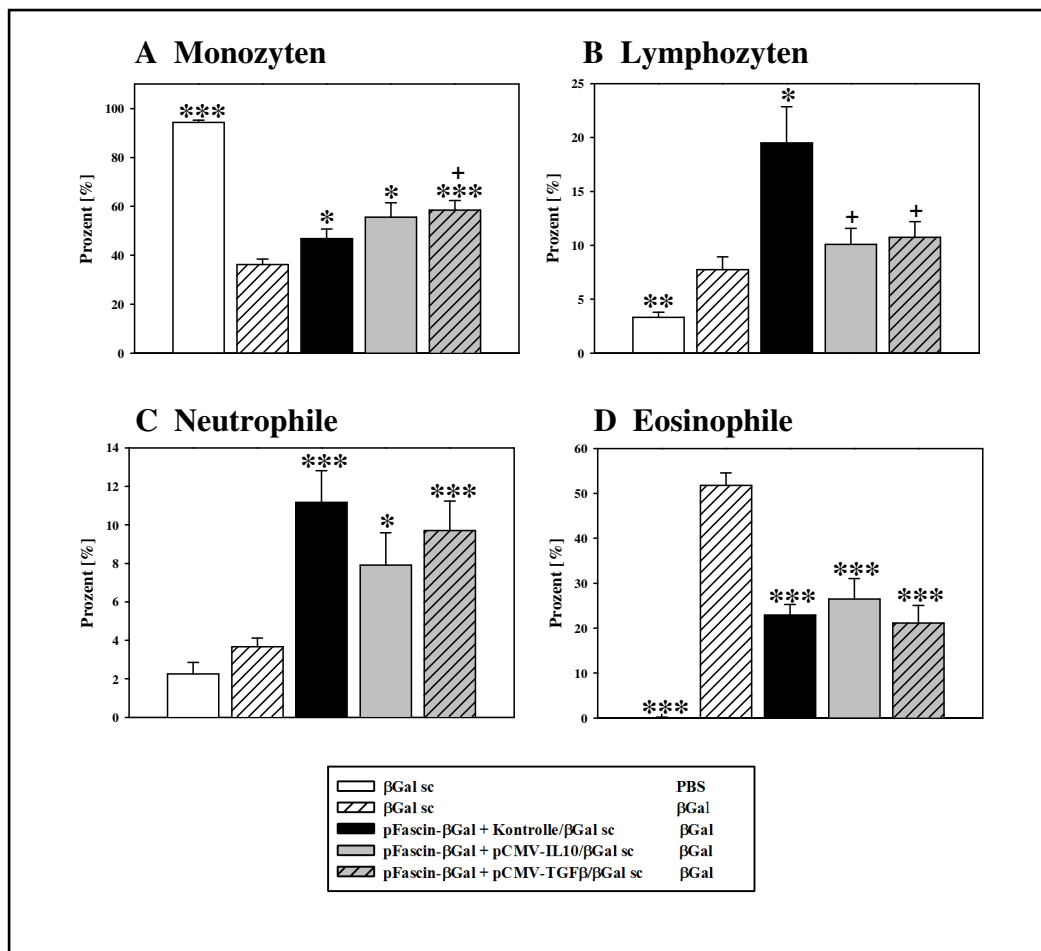


**Abb. 12: Einfluss einer protektiven DNA-Immunisierung auf die Atemwegsreaktivität im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung** BALB/c-Mäuse (n=15) wurden mit pFascin-βGal zusammen mit pFascin-EGFP, pCMV-IL-10 oder pCMV-TGF-β mit Hilfe der Genpistole immunisiert und im Anschluss daran dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit βGal-Protein subkutan sensibilisiert. Kontrollmäuse wurden nur mit dem Protein behandelt. Anschließend erfolgte dreimal im Abstand von 24 h eine intranasale Provokation mit 50 µg βGal bzw. zur Kontrolle bei einem Teil der ausschließlich mit Protein sensibilisierten Tiere eine intranasale Gabe von PBS. Im Anschluss daran wurde eine nicht-invasive Messung der Atemwegsreaktivität im Ganzkörper-Plethysmographen durchgeführt. Dabei wird nach der Gabe steigender Methacholin-Dosen (3,125, 6,25, 12,5, 25 mg/ml) die Lungenfunktion gemessen. In der Graphik ist der PenH-Wert als Maß für die Atemwegsreaktivität abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 Experimenten. Signifikante Unterschiede der prozentualen Abweichung von der Basislinie von Mäusen, die mit βGal-Protein sensibilisiert und mit PBS behandelt wurden (weiße Kreise) im Vergleich zur Positivkontrolle, die mit Protein sensibilisiert und mit βGal provoziert wurden (schwarze Rauten) sind gekennzeichnet (\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Signifikante Unterschiede zwischen Mäusen, die mit pFascin-βGal + Kontrolle (schwarze Kreise) bzw. mit pFascin-βGal + pCMV-IL-10 (schwarze Dreiecke) immunisiert wurden im Vergleich zu positiven proteinsensibilisierten Kontrolltieren sind gekennzeichnet (#  $p \leq 0,05$  für pFascin-βGal + Kontrolle bzw. +  $p \leq 0,05$ , ++  $p \leq 0,01$  für pFascin-βGal + pCMV-IL-10). In den mit pFascin-βGal + pCMV-TGF-β (schwarze Vierecke) immunisierten Tieren waren die Unterschiede im Vergleich zur Positivkontrolle statistisch nicht signifikant.

Bei den negativen Kontrollmäusen waren Monozyten die am häufigsten vorhandenen Zellen in der bronchoalveolären Lavage. Alle anderen Zellen konnten nur mit einem sehr geringen Prozentsatz nachgewiesen werden. Bei den proteinsensibilisierten positiven Kontrolltieren hingegen sank der Anteil an Monozyten und Eosinophile Granulozyten waren der vorherrschende Zelltyp. Neutrophile und Lymphozyten waren ebenfalls vorhanden, allerdings nur zu einem geringen Anteil. Eine Koapplikation mit pFascin- $\beta$ Gal und pFascin-EGFP gefolgt von einer Proteinsensibilisierung und anschließender Provokation mit  $\beta$ Gal führte zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an Lymphozyten in der Lunge. Es konnten signifikant mehr Monozyten nachgewiesen werden als bei den positiven Kontrolltieren und auch der Anteil an neutrophilen Granulozyten stieg signifikant an. Eosinophile hingegen waren signifikant weniger in den Lungen dieser Tiere nachweisbar verglichen mit der Positivkontrolle. Eine Kovakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IL -10 vor der Proteinsensibilisierung führte ebenfalls zu einem erhöhten Vorkommen von Monozyten und zu einer Reduktion der Anzahl an Eosinophilen in der Lunge. Der Anteil an Neutrophilen war signifikant erhöht verglichen mit den positiven Kontrollmäusen lag aber unter dem der mit der Kontrolle Koimmunisierten Tiere. Der Anteil an Lymphozyten war signifikant reduziert verglichen mit den Tieren, die mit pFascin- $\beta$ Gal und der Kontrolle immunisiert wurden. Eine Kovakzinierung mit pCMV-TGF- $\beta$  führte ebenfalls zu einem signifikant höheren prozentualen Anteil an Monozyten in der Lunge verglichen mit den proteinsensibilisierten, mit  $\beta$ Gal provozierten Kontrollmäusen. Der Anteil an Monozyten lag auch signifikant über dem der mit pFascin- $\beta$ Gal und der Kontrolle immunisierten Tiere. Neutrophile waren signifikant mehr in der Lunge vorhanden als in den Positivkontrolle, der Anteil an Eosinophilen hingegen war signifikant reduziert. Lymphozyten konnten zu einem signifikant geringeren Anteil nachgewiesen als in den mit pFascin- $\beta$ Gal und der Kontrolle vakzinieren Tieren.

Einhergehend mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen einer moderaten Reduktion der Atemwegshyperreaktivität kommt es nach einer Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$  zu einem signifikant geringerem prozentualen Anteil an allergeninduzierten eosinophilen Granulozyten, nach intranasaler Provokation mit  $\beta$ Gal, im Vergleich zu den proteinsensibilisierten und mit  $\beta$ Gal behandelten Kontrolltieren. Der Anteil der für eine Th2-Antwort charakteristischen Zellen war also deutlich vermindert. Der Anteil an Neutrophilen stieg hingegen nach Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal. Diese waren allerdings, verglichen damit, nach Kovakzinierung mit pCMV-IL-10 und pCMV-TGF- $\beta$  reduziert. Verglichen mit den mit pFascin- $\beta$ Gal und der Kontrolle

immunisierten Tieren war der Anteil an Lymphozyten signifikant reduziert nach Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IL-10 und pCMV-TGF- $\beta$ .

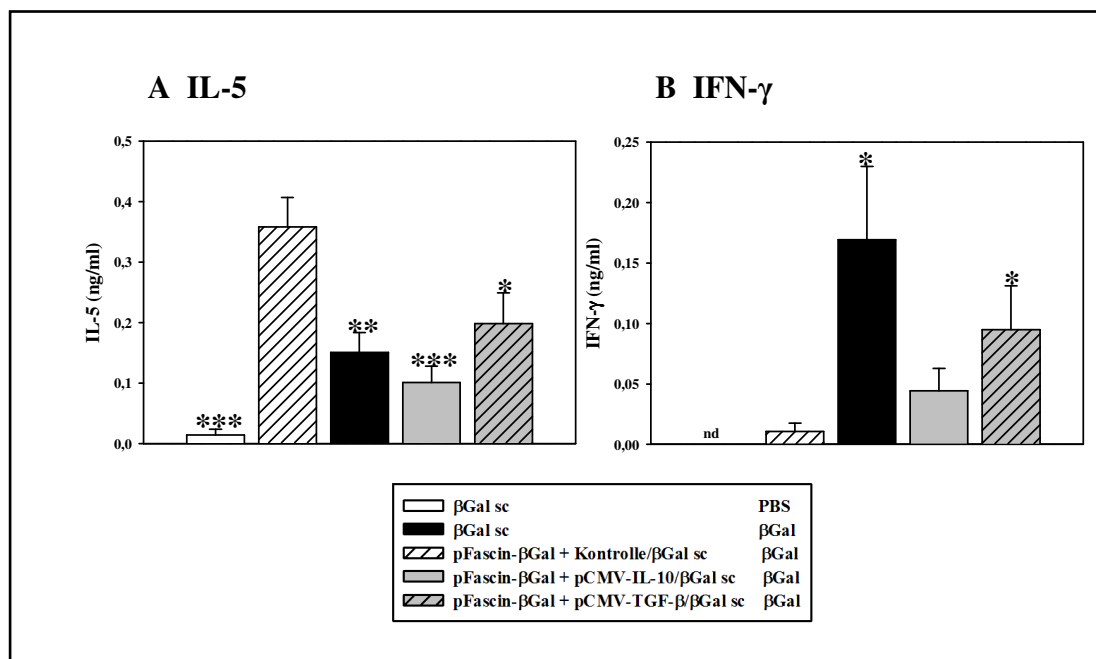


**Abb. 13: Einfluss einer protektiven DNA-Immunisierung auf die prozentuale Zusammensetzung der Zellen in der BAL im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung** BALB/c-Mäuse (n=16) wurden mit pFascin- $\beta$ Gal + Kontrolle (schwarze Balken), pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-IL-10 (graue Balken), pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-TGF- $\beta$  (grau schraffierte Balken) immunisiert, mit  $\beta$ Gal subkutan sensibilisiert und anschließend durch intranasale Gabe von  $\beta$ Gal provoziert. Kontrolltiere wurden mit  $\beta$ Gal sensibilisiert und mit  $\beta$ Gal intranasal (weiß schraffierte Balken) oder PBS (weiße Balken) behandelt. 2 Tage nach der letzten Provokation wurde eine Spülung der Lungen durchgeführt und anschließend  $5 \times 10^5$  Zellen mit Hilfe einer Zytospin-Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht, einer Diff-Quick®-Färbung unterzogen und mikroskopisch anhand der Morphologie und des Färbeverhaltens charakterisiert und ausgezählt. Hierbei wurden Monozyten (A), Lymphozyten (B), Neutrophile (C) und Eosinophile (D) unterschieden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier Experimenten. Signifikante Unterschiede der prozentualen Anteile an Zellen nach Immunisierung im Vergleich zu den mit Protein sensibilisierten Tieren, die mit  $\beta$ Gal provoziert wurden, sind gekennzeichnet (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Signifikante Unterschiede der mit pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-IL-10/-TGF- $\beta$  Immunisierten Tiere im Vergleich zu den mit pFascin- $\beta$ Gal + Kontrolle immunisierten Tiere sind gekennzeichnet(<sup>+</sup>  $p \leq 0,05$ ).

Abbildung 14 zeigt die in dem Überstand der bronchoalveolären Lavage gemessenen Zytokine. Das Th2-Zytokin IL-5 und auch das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  konnten in allen gemessenen Überständen in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. In der BAL der negativen Kontrolltiere konnte die geringste Konzentration an IL-5 nachgewiesen werden. IFN- $\gamma$  konnte hier nicht detektiert werden. Nach Provokation mit  $\beta$ Gal hingegen stieg die Konzentration an IL-5 signifikant an, während sich IFN- $\gamma$  nur marginal nachweisen ließ. Die Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit der Kontrolle führte zu einer signifikanten Reduktion von IL-5, aber auch zu signifikant erhöhten Mengen an IFN- $\gamma$ . Die Vakzinierung in Kombination mit pCMV-IL-10 und pCMV-TGF- $\beta$  führte ebenfalls zu einer reduzierten Bildung von IL-5. Die Konzentration an IFN- $\gamma$  war, verglichen mit der nach Koimmunisierung mit dem Kontroll-Plasmid, aber deutlich vermindert.

Auch in diesen Ergebnissen zeigt sich, wie schon in den vorherigen, dass eine der Proteinsensibilisierung vorangegangene biolistische DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal die Immunantwort der Tiere beeinflusst. Im Vergleich zur reinen Proteinsensibilisierung wird die Th2-Antwort inhibiert, wobei auch Th1-Zellen eine Rolle zu spielen scheinen. Es sind sowohl Th1 als auch Th2 Zytokine in geringen Konzentrationen nachweisbar.

Eine Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IL-10 und auch mit pCMV-TGF- $\beta$  führt ebenfalls zu einer signifikanten Inhibition der Th2-Antwort. Die Th1-Antwort kann, verglichen mit den mit pFascin- $\beta$ Gal und der Kontrolle immunisierten Tieren, jedoch auch inhibiert werden.



**Abb. 14: Einfluss einer protektiven DNA-Immunisierung auf die IFN- $\gamma$ - und IL-5-Produktion in der Lunge im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung** BALB/c Mäuse (n=16) wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit pFascin- $\beta$ Gal + Kontroll-Plasmid (schwarze Balken), pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-IL-10 (graue Balken) oder pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-TGF- $\beta$  (grau schraffierte Balken) mit der Genpistole immunisiert, anschließend subkutan mit  $\beta$ Gal Protein sensibilisiert und mit  $\beta$ Gal intranasal provoziert Kontrollmäuse wurden mit dem Protein sensibilisiert und mit  $\beta$ Gal (weiß schraffierte Balken) bzw. zur Kontrolle mit PBS (weiße Balken) behandelt. An Tag 47 wurde die Lunge der Tiere gespült und anschließend das von den Zellen in der Lunge gebildete IL-5 (A) und IFN- $\gamma$  (B) in den Überständen der bronchoalveolären Lavage mittels ELISA nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 Experimenten. Signifikante Unterschiede der nachgewiesenen Zytokin-Konzentrationen im Vergleich zu proteinsensibilisierten Tieren, die mit  $\beta$ Gal provoziert wurden sind gekennzeichnet (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Die Unterschiede der mit pCMV-IL-10 und pCMV-TGF- $\beta$  immunisierten Tiere im Vergleich zu der mit  $\beta$ Gal immunisierten Positivkontrolle waren nicht signifikant.

### 3.2.4 Effekt einer prophylaktischen Immunisierung mit pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$ auf die die Induktion IFN- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen

Am Tag der bronchoalveolären Lavage wurde ein EliSpot zum Nachweis antigenspezifischer IFN- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. Eine Proteinsensibilisierung führte nur zu einer geringfügigen

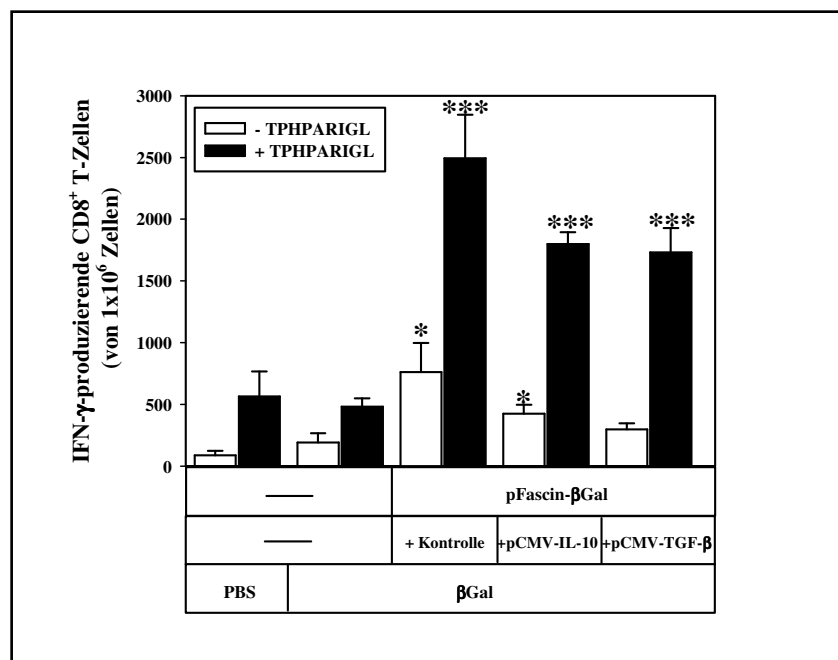


Einwanderung antigenspezifische IFN- $\gamma$ -produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen in die Lunge. Wurden die Mäuse vor der Sensibilisierung mit dem Protein einer DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal unterzogen konnte eine höhere Anzahl antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen nachgewiesen werden. Hierbei konnten die meisten zytotoxischen T-Zellen in den Lungen der Tiere nachgewiesen werden, die mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit dem Kontroll-Plasmid immunisiert wurden. Hier konnte eine signifikant höhere Induktion von CD8<sup>+</sup> antigenspezifischen IFN- $\gamma$ -produzierenden T-Zellen nachgewiesen werden, verglichen mit der proteinsensibilisierten Positivkontrolle. Die Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal zusammen pCMV-IL-10 bzw. pCMV-TGF- $\beta$  hingegen reduzierte die Anzahl der IFN- $\gamma$ -produzierenden T-Zellen verglichen mit den mit pFascin- $\beta$ Gal und der Kontrolle vakzinieren Tieren gleichermaßen. Die Anzahl dieser Zellen war allerdings signifikant erhöht im Vergleich zur proteinsensibilisierten Positivkontrolle.

### **3.3 Untersuchungen zum Einfluss einer biolistischen DNA-Immunisierung mit $\beta$ Gal und IDO-kodierender Plasmid-DNA auf die Entstehung einer antigenspezifischen Immunantwort**

Indolamin-2,3-Dioxygenase wird von Monozyten, Dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert und ist das erste und limitierende Enzym des Tryptophan-Stoffwechsels. IDO katalysiert den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan zu Kynureninen [Mellor und Munn, 2004]. Diese wirken toxisch, proapoptotisch und antiproliferativ [Terness *et al.*, 2002]. Die Expression von IDO ist daher mit der Immunsuppression und der Induktion peripherer Toleranz, sowie der Induktion regulatorischer T-Zellen assoziiert [Fallarino *et al.*, 2003, Mellor und Munn, 2004]. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt einer Koimmunisierung von  $\beta$ Gal kodierender DNA zusammen mit IDO kodierender DNA auf eine antigenspezifische Immunantwort untersucht.

Dazu wurden zunächst die IDO-kodierenden Plasmide *in vitro* mittels HPLC ("High Pressure Liquid Chromatography") auf ihre Funktionalität getestet.



**Abb.15: Einfluss einer protektiven DNA-Immunisierung auf die Induktion CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ -produzierender zytotoxischer T-Zellen in der Lunge im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung**

BALB/c Mäuse (n=16) wurden dreimal im Abstand von einer Woche, mit Hilfe der Genpistole, mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit einem Kontroll-Plasmid, pCMV-IL-10 oder pCMV-TGF- $\beta$  immunisiert, anschließend subkutan mit  $\beta$ Gal sensibilisiert und mit  $\beta$ Gal intranasal provoziert. Kontrollmäuse wurden mit dem Protein sensibilisiert und mit  $\beta$ Gal bzw. zur Kontrolle mit PBS behandelt. An Tag 47 wurden die Lungen der Tiere isoliert und die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde mittels CTL-EliSpot ermittelt. Dazu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in An- (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) des  $\beta$ Gal-Peptides TPHPARIGL kultiviert. Nach 20 Stunden erfolgte die Auswertung des Tests. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier Experimenten. Signifikante Unterschiede der Induktion zytotoxischer T-Zellen von pFascin- $\beta$ Gal + Kontrolle, pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-IL-10 bzw. pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-TGF- $\beta$  immunisierten Tieren im Vergleich zu proteinsensibilisierten mit  $\beta$ Gal behandelten Tieren sind gekennzeichnet, (\* $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Die Unterschiede der mit IL-10 und TGF- $\beta$  immunisierten Tiere im Vergleich zu der mit  $\beta$ Gal immunisierten Positivkontrolle waren nicht signifikant.

Im Anschluss wurde der Effekt einer Koapplikation von  $\beta$ Gal-kodierender Plasmid DNA unter Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors (pCMV- $\beta$ Gal) bzw. des für Dendritische Zellen spezifischen Fascin-Promotors (pFascin- $\beta$ Gal) zusammen mit EGFP kodierenden Kontroll-Vektoren oderIDO-kodierender Plasmid-DNA unter der Kontrolle des

CMV- bzw. des Fascin-Promotors (pCMV-IDO bzw. pFascin-IDO) auf die Haut von Mäusen untersucht.

Die Auswirkung der genetischen Vakzinierung auf eine nachfolgende induzierte  $\beta$ Gal-spezifische Immunantwort wurde im Anschluss verglichen.

Dazu wurden die antigenspezifischen Immunglobulin-Titer im Serum der mit den verschiedenen Plasmid-Kombinationen immunisierten Mäuse ermittelt sowie die Zytokinproduktion von Milz- und Lymphknotenzellen *in vitro* untersucht. Außerdem wurden Tests zur Induktion der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen durchgeführt, die Atemwegsreaktivität der Tiere wurde gemessen und die Zusammensetzung der Zellen in der Bronchoalveolären Lavage wurde bestimmt. Des Weiteren wurde untersucht, ob es bei einer DNA-Immunisierung mit IDO kodierender Plasmid-DNA zu einer Induktion regulatorischer T-Zellen kommt.

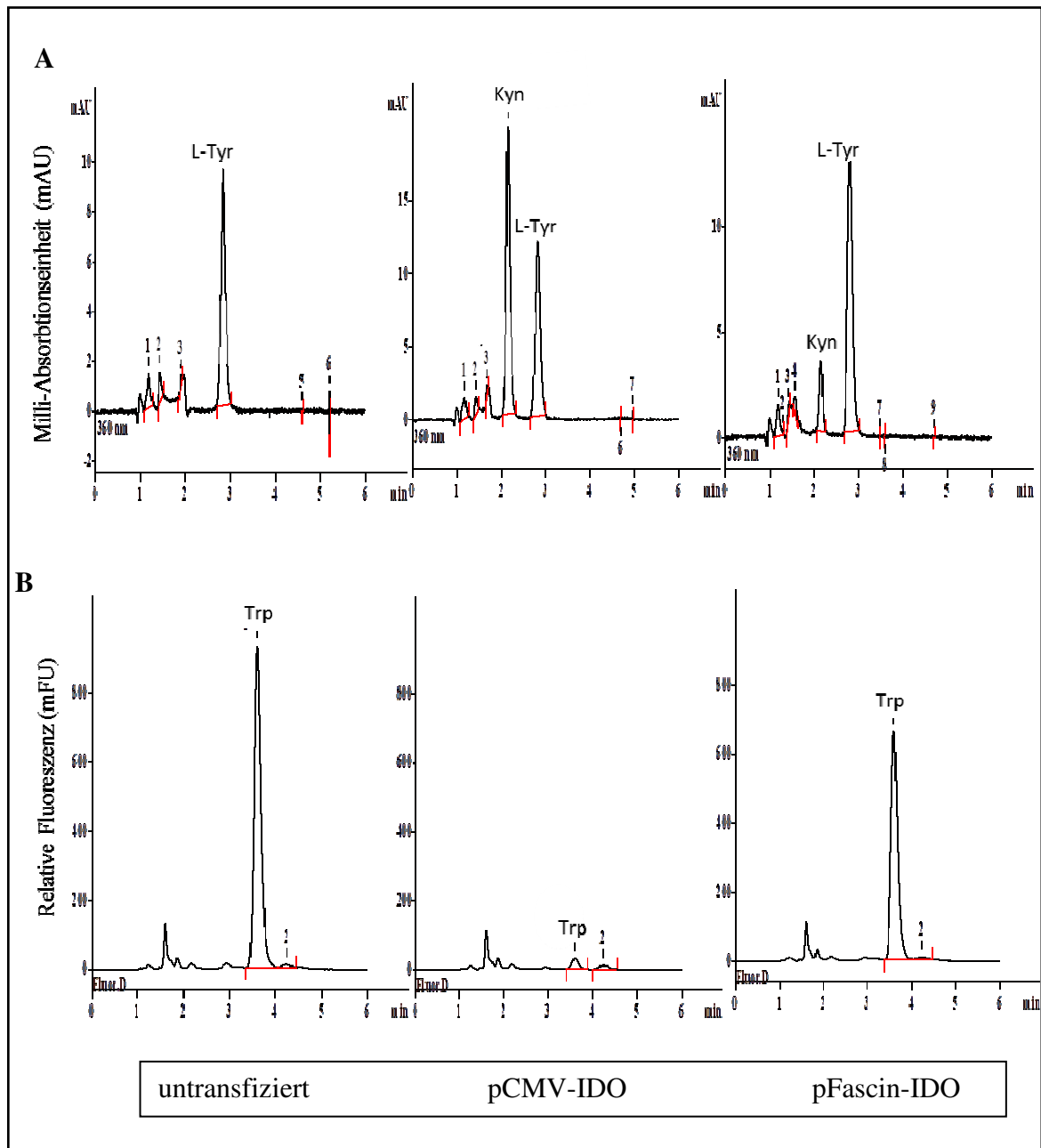
### **3.3.1 *In vitro*-Analysen zum Nachweis der Funktionalität IDO-kodierender Plasmid-DNA**

Die IDO kodierenden Plasmide wurden zunächst auf ihre Funktionalität getestet. Es wurden NIH-3T3 Zellen zum Test der Funktionalität verwendet, da sie Fascin exprimieren und so auch die Funktionalität von IDO unter der Kontrolle des Fascin-Promotors getestet werden konnte. Dazu wurden die NIH-3T3 Zellen transient mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Fugene HD transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Austausch des tryptophanhaltigen Kulturmediums der Zellen gegen Kulturmedium, dem eine definierte Konzentration an Tryptophan (25  $\mu$ mol) zugesetzt wurde. Nach einer weiteren 24-stündigen Kultur wurden der Tryptophan-Abbau und die daraus resultierende Bildung von Kynureninen im Überstand der Zellen mittels HPLC bestimmt. Die Bestimmung der Parameter mittels HPLC erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ellen Closs am Institut für Pharmakologie in Mainz.

In Abbildung 16 ist ein repräsentatives Beispiel eines Chromatogramms gezeigt. Bei der Hochdruckflüssigkeitschromatographie können unterschiedliche Substanzen identifiziert und mit Hilfe von Standards quantifiziert werden. Hierbei wird das zu untersuchende

Stoffgemisch, in diesem Fall die Kulturüberstände der transfizierten und untransfizierten 3T3-Zellen, zusammen mit einem Laufmittel, der mobilen Phase, durch eine Trennsäule geleitet, die eine stationäre Phase enthält. Je nach der Stärke der Wechselwirkung der Substanzen mit der stationären Phase verbleiben sie unterschiedlich lange in der Säule und können dann am Ende der Säule mit einem Detektor nachgewiesen werden. Die verschiedenen Zeitpunkte, zu denen die verschiedenen Substanzen am Ende der Säule nachgewiesen werden können bezeichnet man als Retentionszeiten.

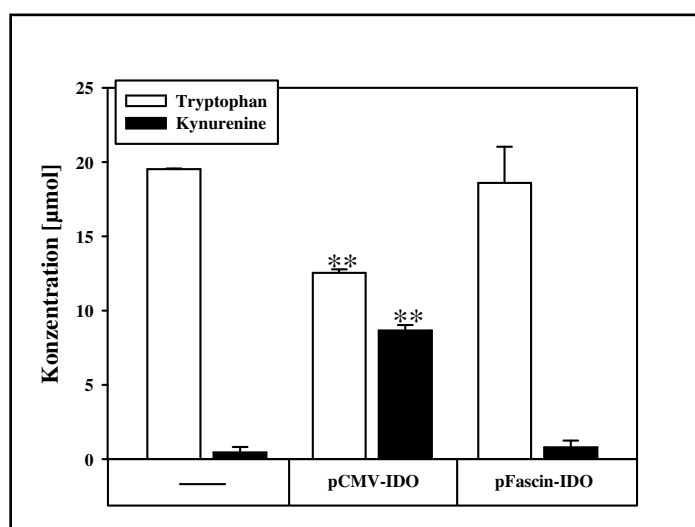
In Abbildung 16 A ist die Absorption des Detektors als Milli-Absorptionseinheit in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Hier ist das Signal des detektierten Kynurenins als Peak im Vergleich zu dem Signal des als internen Standard verwendeten L-Tyrosin gezeigt. Für die Überstände der untransfizierten und der mit pFascin-IDO transfizierten 3T3 Zellen waren die für Kynurenine charakteristischen Peaks nur sehr niedrig, wohingegen nach Transfektion mit pCMV-IDO eine deutliche Erhöhung des Peaks zu beobachten ist. In Abbildung 16 B ist die relative Fluoreszenz zum Nachweis des Tryptophans dargestellt. Die größte Menge an Tryptophan konnte in den Überständen der untransfizierten 3T3 nachgewiesen werden. Eine Transfektion mit pCMV-IDO führt zu einem deutlich niedrigeren für das Tryptophan charakteristischen Peak, wohingegen nach Transfektion mit pFascin-IDO vergleichsweise mehr Tryptophan nachweisbar war.



**Abb. 16: Funktionalitätsnachweis IDO-kodierender Plasmide mittels HPLC - Beispiel eines Chromatogramms** NIH-3T3 Zellen wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Fugene HD mit pCMV-IDO oder pFascin-IDO transfiziert. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium gegen Kulturmedium mit 25  $\mu$ mol Tryptophan ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 Stunden kultiviert. Der Tryptophanabbau und die Akkumulation von Kynureninen wurden mittels HPLC bestimmt. In **A** ist die Milli-Absorbtionseinheit dargestellt, hierbei wird die Absorbtion des Detektors gegen die Zeit aufgetragen, in **B** die relative Fluoreszenz, die mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors detektiert wird.

In Abbildung 17 sind zusammenfassend der Tryptophanabbau und die daraus resultierende Akkumulation von Kynureninen graphisch dargestellt, wobei die Mittelwerte aus zwei

Experimenten gezeigt sind. Im Überstand der untransfizierten 3T3-Zellen konnte kein Abbau des Tryptophans und somit auch kein vermehrtes Vorkommen an Kynureninen gemessen werden. Bei Zellen, die mit pFascin-IDO transfiziert wurden, waren kein Tryptophanabbau und keine Bildung von Kynureninen zu beobachten. In den Überständen von mit pCMV-IDO transfizierten Zellen kam es zu einem deutlichen Abbau des Tryptophans im Vergleich zu den unbehandelten 3T3-Zellen und damit einhergehend zu einem signifikant erhöhten Vorkommen von Kynureninen in den Überständen.



**Abb. 17: Funktionalitätsnachweis IDO-kodierender Plasmide mittels HPLC** NIH-3T3 Zellen wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Fugene HD mit pCMV-IDO oder pFascin-IDO transfiziert. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium gegen Kulturmedium mit 25 µmol Tryptophan ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurde der Abbau des Tryptophans und die Bildung von Kynureninen in den Überständen der Zellen mittels HPLC bestimmt (n=2). Signifikante Unterschiede des Anteils an Tryptophan, bzw. Kynureninen in den Überständen transfizierter Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen sind gekennzeichnet (\*\*  $p \leq 0,01$ ).

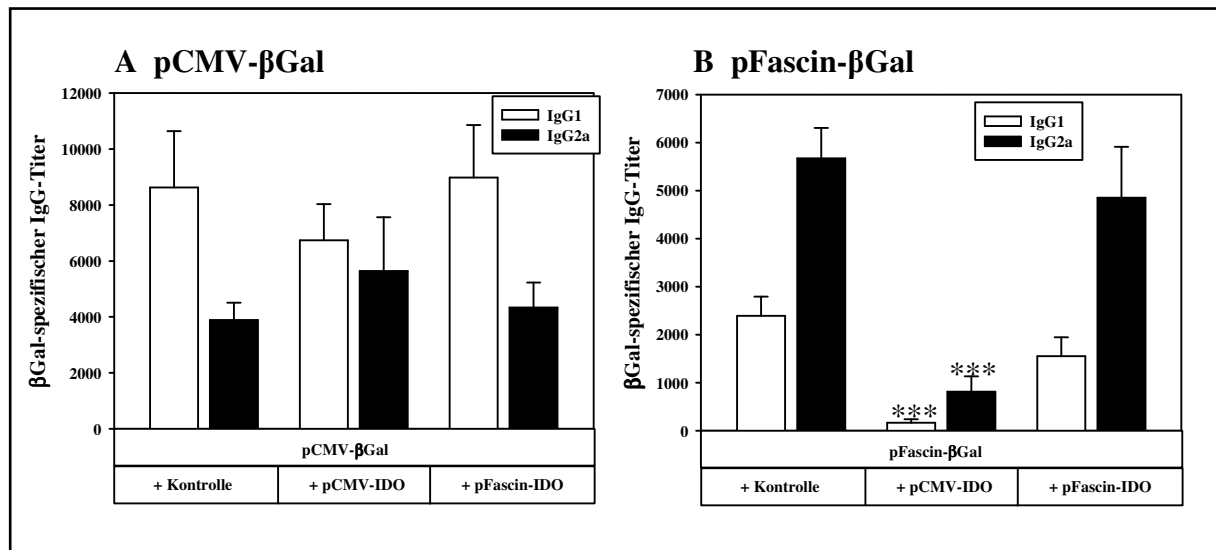
Die Expression von IDO unter Kontrolle des CMV-Promotors führt also zu einem Tryptophanabbau während die IDO-Expression unter Kontrolle des Fascin-Promotors nicht zu einem Abbau des Tryptophans führte.

### **3.3.2 Effekt einer biolistischen Koimmunisierung mit $\beta$ Gal- und IDO-kodierenden Plasmid-Vektoren auf die transgenspezifische humorale Immunantwort**

BALB/c-Mäuse wurden zunächst, wie in Abbildung 1 gezeigt, dreimal im Abstand von jeweils sieben Tagen mit der Genpistole immunisiert. Eine Woche später erfolgte eine Blutentnahme zum Nachweis von antigenspezifischem IgG1 und IgG2a mittels ELISA.

In Abbildung 18 ist die Produktion von  $\beta$ Gal spezifischem IgG1 und IgG2a in den Seren der immunisierten Mäusen dargestellt. Eine biolistische DNA-Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid pFascin-EGFP führte vorwiegend zur Produktion von IgG1, wobei auch eine, wenn auch geringere, Bildung von IgG2a zu beobachten war. Eine Koimmunisierung von pCMV- $\beta$ Gal mit pFascin-IDO führte zu einem vergleichbaren IgG-Profil wie dem nach Immunisierung mit dem Kontroll-Plasmid. Eine Koexpression von pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO führte zu einer leicht inhibierten IgG1-Produktion, aber zu einer Erhöhung der Menge an IgG2a im Vergleich zu den mit pCMV- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid bzw. mit pFascin-IDO immunisierten Mäusen. Diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant.

Nach einer biolistischen DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal war die IgG-Produktion in allen Gruppen geringer als nach Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal. Eine Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pFascin-EGFP führte zu einer erhöhten Konzentration von IgG2a. IgG1 wurde in geringeren Mengen gebildet. Nach einer Koapplikation von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pFascin-IDO konnte ebenfalls mehr IgG1 als IgG2a nachgewiesen werden, wobei es zu einer moderaten Reduktion von Antikörpern beider Isotypen verglichen mit den mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten Tieren kam. Durch eine Koimmunisierung mit pCMV-IDO war sowohl die IgG1- als auch die IgG2a-Produktion signifikant reduziert im Vergleich zu den mit dem Kontroll-Plasmid koimmunisierten Mäusen.



**Abb. 18: Einfluss einer Koapplikation von IDO kodierenden Vektoren auf die  $\beta$ Gal-spezifische IgG-Produktion nach Immunisierung mit  $\beta$ Gal kodierenden Vektoren** BALB/c Mäuse (pCMV- $\beta$ Gal: n=12, pFascin- $\beta$ Gal: n=28-32) wurden dreimal im Abstand von einer Woche mit pCMV- $\beta$ Gal oder pFascin- $\beta$ Gal sowie mit dem Kontroll-Plasmid pFascin-EGFP, mit pCMV-IDO oder mit pFascin-IDO mit der Genpistole immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und der Gehalt des  $\beta$ Gal-spezifischen IgG1 und IgG2a im Serum wurde mittels ELISA ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der IgG-Titer individueller Seren. Signifikante Unterschiede zu der Antikörperproduktion in den Mäusen, die jeweils mit dem Kontroll-Plasmid immunisiert wurden sind gekennzeichnet, (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

### 3.3.3 Effekt einer biolistischen Koimmunisierung mit $\beta$ Gal- und IDO-kodierenden Plasmid-Vektoren auf die transgenspezifische Zytokinproduktion

Den mit der Genpistole immunisierten Mäusen wurden die drainierenden Lymphknoten und die Milz entnommen. Die daraus gewonnenen Zellen wurden für 72 Stunden in An- oder Abwesenheit von  $\beta$ Gal kultiviert, im Anschluss daran wurde die Zytokin-Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

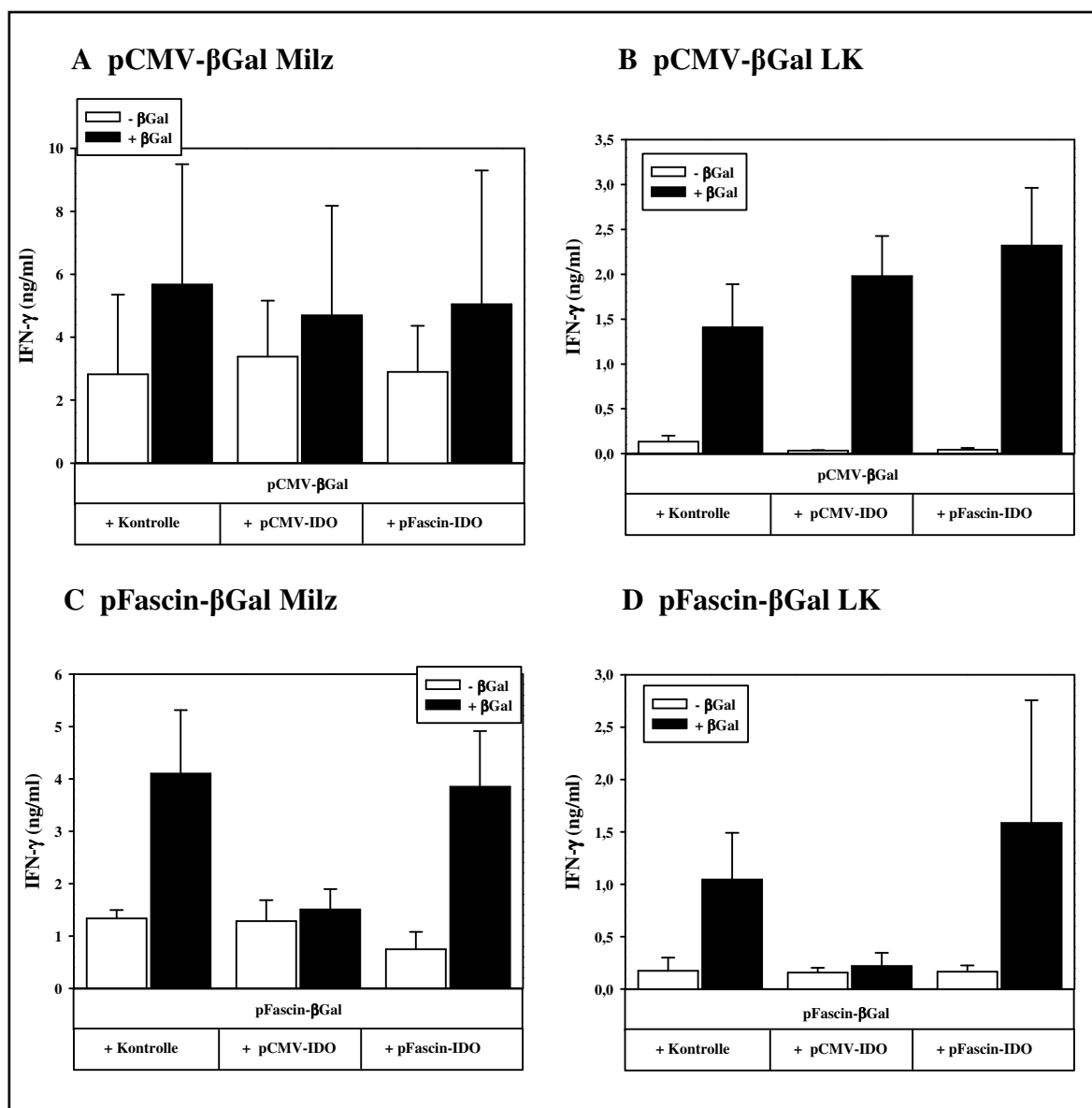
In Abbildung 19 ist die IFN- $\gamma$ - und in Abbildung 20 die IL-5-Produktion nach Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal bzw. pFascin- $\beta$ Gal gezeigt. Hierbei waren in den Kulturüberständen von unstimulierten Zellen eine geringere Zytokin-Konzentrationen nachweisbar als in den Zellüberständen stimulierter Zellen. Das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  konnte in den Milz- und Lymphknoten-Überständen der mit pCMV- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten Mäuse nachgewiesen werden. In den Überständen der stimulierten Milzzellen war hierbei



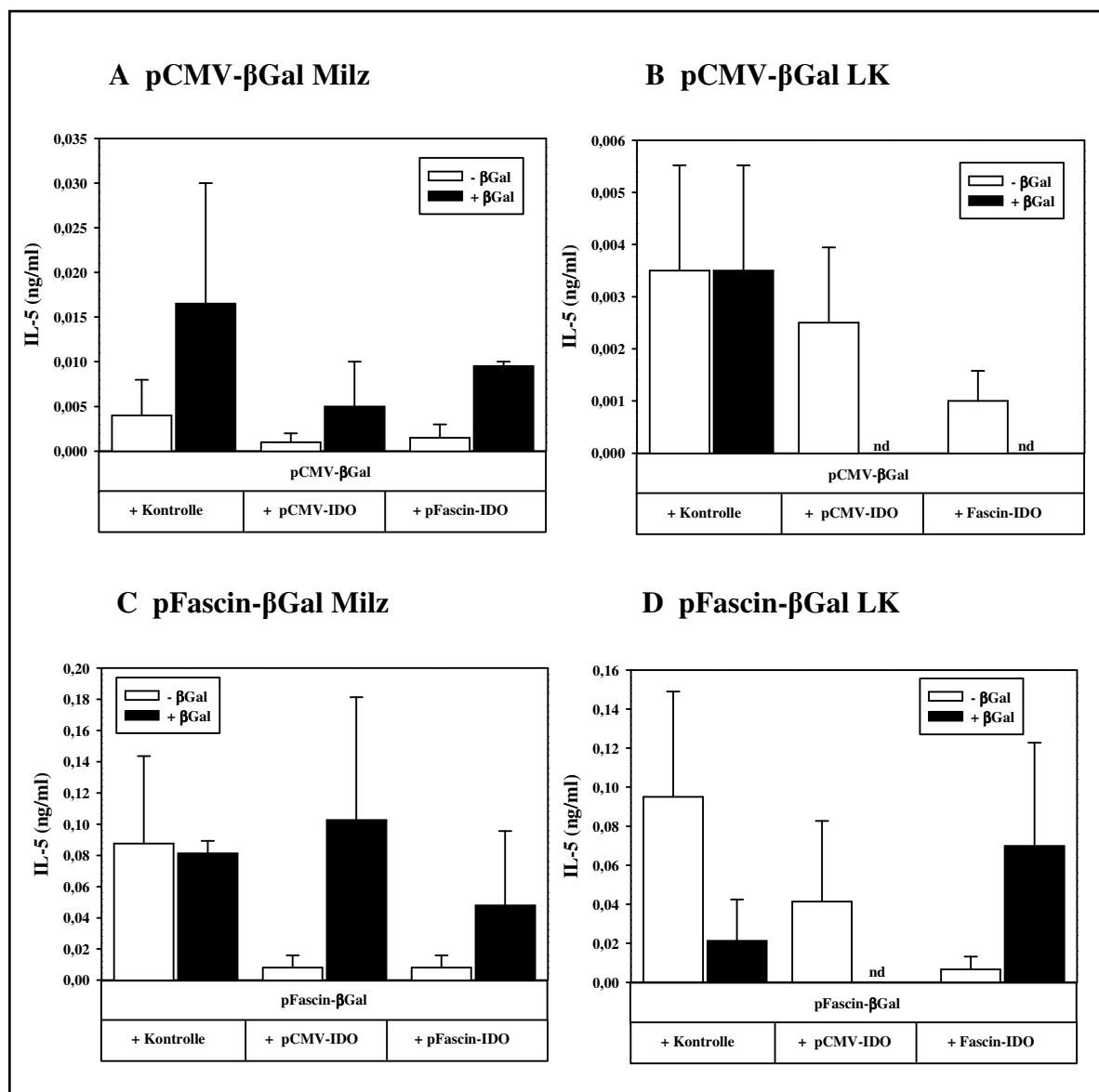
mehr IFN- $\gamma$  nachweisbar als in den Überständen der Lymphknotenzellen. Eine Koimmunisierung mit pCMV-IDO und pFascin-IDO führte nicht zu einer Inhibition der IFN- $\gamma$ -Produktion. In den Milzzellüberständen war IFN- $\gamma$  in etwa vergleichbaren Konzentrationen nachweisbar. Die Konzentration an IFN- $\gamma$  in den Lymphknotenüberständen war durch eine Koimmunisierung mit pCMV-IDO und pFascin-IDO erhöht verglichen mit den Überständen von Zellen der mit dem Kontroll-Plasmid koimmunisierten Mäusen. Das Th2-spezifische Zytokin IL-5 war nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar, die weit unter denen der detektierten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen lagen. Im Falle von IL-5 lagen die gemessenen Werte nahe der Detektionsgrenze. In der Milz war IL-5 nach einer Koimmunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid in geringen Konzentrationen nachweisbar. Durch eine Koimmunisierung mit pCMV-IDO war die IL-5-Produktion vermindert im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Eine Koapplikation von pFascin-IDO führte verglichen damit zu einer moderat höheren IL-5-Konzentration. In den Kulturüberständen der Lymphknotenzellen war nach Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal in Kombination mit dem Kontroll-Plasmid eine IL-5-Konzentration detektierbar, die noch unter der detektierten Konzentration in den Milzen lag und insgesamt sehr gering war. Des Weiteren war die Konzentration an IL-5 in den Überständen stimulierter und unstimulierter Zellen etwa gleich. In den stimulierten Lymphknotenzellüberständen der mit pCMV- und pFascin-IDO kovakzinierten Tiere war kein IL-5 detektierbar. In den unstimulierten Kulturen der mit pCMV-IDO koimmunisierten Mäuse hingegen konnte IL-5 nachgewiesen werden. Die Konzentration war moderat vermindert verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Vakzinierung in Kombination mit pFascin-IDO führte zu einer Verminderung der IL-5-Produktion in den unstimulierten Zellen.

Bei den mit pFascin- $\beta$ Gal immunisierten Tieren konnte IFN- $\gamma$  in etwas geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden, als bei den mit pCMV- $\beta$ Gal immunisierten Mäusen. Die gemessene IFN- $\gamma$ -Konzentration der Überstände stimulierter Milzzellen lag bei den mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten Tieren bei etwa 4 ng/ml. In den Überständen der Zellen der mit pFascin- $\beta$ Gal und pFascin-IDO immunisierten Mäuse war die IFN- $\gamma$  Konzentration vergleichbar mit der aus den Überständen von Zellen der mit dem Kontroll-Plasmid immunisierten Mäuse. Die geringste Konzentration war bei den mit einer Kombination aus pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IDO behandelten Tieren nachweisbar. Ein ähnliches Bild ergab sich in den Überständen der stimulierten Lymphknotenzellen, wobei hier die detektierte Konzentration an IFN- $\gamma$  deutlich unter der in den Milzzellkulturen gemessenen lag. Nach einer Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid konnte etwa 1 ng/ml IFN- $\gamma$  in den Kulturüberständen stimulierter Zellen nachgewiesen

werden. Durch eine Koimmunisierung mit pCMV-IDO war die IFN- $\gamma$ -Produktion auf unter 0,5 ng/ml vermindert, durch eine Koapplikation von pFascin-IDO hingegen bis auf etwa 1,5 ng/ml erhöht. IL-5 war nach Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid in der Milz nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar. Außerdem lag die Konzentration an IL-5 in den Überständen unstimulierter Zellen leicht über der der stimulierten Überstände. Durch eine Koimmunisierung mit pFascin-IDO war die Konzentration an IL-5 in den Überständen im Vergleich dazu inhibiert. Eine Koapplikation von pCMV-IDO hingegen führte zu einer leicht erhöhten IL-5-Produktion verglichen mit der Kontrollgruppe in den stimulierten Kulturen. In den unstimulierten Milzzellüberständen konnte IL-5 hingegen nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. In den Kulturüberständen der Lymphknotenzellen der mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten Tiere konnte IL-5 in den Überständen stimulierter Zellen ebenfalls nur in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. In den unstimulierten Zellen war die IL-5-Produktion verglichen dazu erhöht. Die Koimmunisierung mit pCMV-IDO inhibierte die IL-5-Produktion in den stimulierten Lymphknotenüberständen. Hier war kein IL-5 detektierbar. In den unstimulierten Kulturen war nur eine geringe Konzentration IL-5 nachweisbar, die unter der detektierten Menge der Kontrolltiere lag. Lediglich nach einer Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pFascin-IDO kam es in den unstimulierten Zellen zu einer geringeren IL-5-Produktion als in den stimulierten Zellen. In den Überständen stimulierter Zellen konnten allerdings auch hier nur sehr geringe Konzentrationen an IL-5 nachgewiesen werden.



**Abb. 19: E: Einfluss einer Koapplikation von pCMV-βGal bzw. pFascin-βGal und pCMV-IDO/pFascin-IDO auf die IFN $\gamma$  -Produktion nach antigenspezifischer Restimulation *in vitro*** BALB/c Mäuse wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit pCMV-βGal (n=12) bzw. pFascin-βGal (n=20) + Kontroll-Plasmid, + pCMV-IDO oder + pFascin-IDO immunisiert. 13 Tage nach der letzten Immunisierung wurden Milz- und Lymphknotenzellen isoliert und in An- (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 25  $\mu$ g/ml  $\beta$ Gal für 72 h kultiviert. Anschließend wurde das von den Zellen gebildete IFN- $\gamma$  in den Kulturüberständen der Milz- (**A**: pCMV-βGal, **C**: pFascin-βGal) und Lymphknoten (**B**: pCMV-βGal, **D**: pFascin-βGal) mittels ELISA nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei Experimenten mit jeweils 4 Mäusen pro Gruppe (pCMV-βGal) bzw. 5 (pFascin-βGal) durchgeführten Experimenten mit jeweils 4 Mäusen pro Gruppe. Die Unterschiede der Gruppen untereinander waren nicht signifikant.



**Abb. 20: Einfluss einer Koapplikation von pCMV-βGal bzw. pFascin-βGal und pCMV-IDO/pFascin-IDO auf die IL-5-Produktion nach antigenspezifischer Restimulation *in vitro*** BALB/c Mäuse wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit pCMV-βGal (n=8) bzw. pFascin-βGal (n=12) + Kontroll-Plasmid, + pCMV-IDO oder + pFascin-IDO immunisiert. 13 Tage nach der letzten Immunisierung wurden Milz- und Lymphknotenzellen isoliert und in An- (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 25 µg/ml βGal für 72 h kultiviert. Anschließend wurde das von den Zellen gebildete IL-5 in den Kulturüberständen der Milz- (A: pCMV-βGal, C: pFascin-βGal) und Lymphknotenzellen (B: pCMV-βGal, D: pFascin-βGal) mittels ELISA nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von drei Experimenten mit jeweils 4 Mäusen pro Gruppe (pCMV-βGal) bzw. 5 (pFascin-βGal) durchgeführten Experimenten mit jeweils 4 Mäusen pro Gruppe. Die Unterschiede der Gruppen untereinander waren nicht signifikant.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Immunisierung mit pCMV-βGal und auch mit pFascin-βGal zu einer Th1 polarisierten Immunantwort, einhergehend mit einer

verstärkten IFN $\gamma$ -Produktion nach Restimulation führte. Eine Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO führte zu einer leicht verminderten Th1-immunantwort einhergehend mit einer verminderten IFN- $\gamma$ -Produktion. Eine Koapplikation von pCMV-IDO zusammen mit pCMV- $\beta$ Gal bewirkte jedoch keine Inhibition der IFN- $\gamma$ -Produktion.

Die Ergebnisse der Analyse der antigenspezifischen IgG-Produktion zusammen mit dem Zytokinprofil der Milz- und Lymphknotenzellen nach Restimulation zeigen, dass bei den mit pFascin- $\beta$ Gal und auch pCMV- $\beta$ Gal immunisierten Tieren eine vor allem Th1-vermittelte Immunantwort vorlag. Dies konnte im Falle der mit pFascin- $\beta$ Gal immunisierten Mäuse durch Koapplikation von pCMV-IDO inhibiert werden., während dies bei den mit pCMV- $\beta$ Gal immunisierten Mäusen nicht der Fall war. Eine Koapplikation von pFascin-IDO hatte keinen signifikanten Effekt.

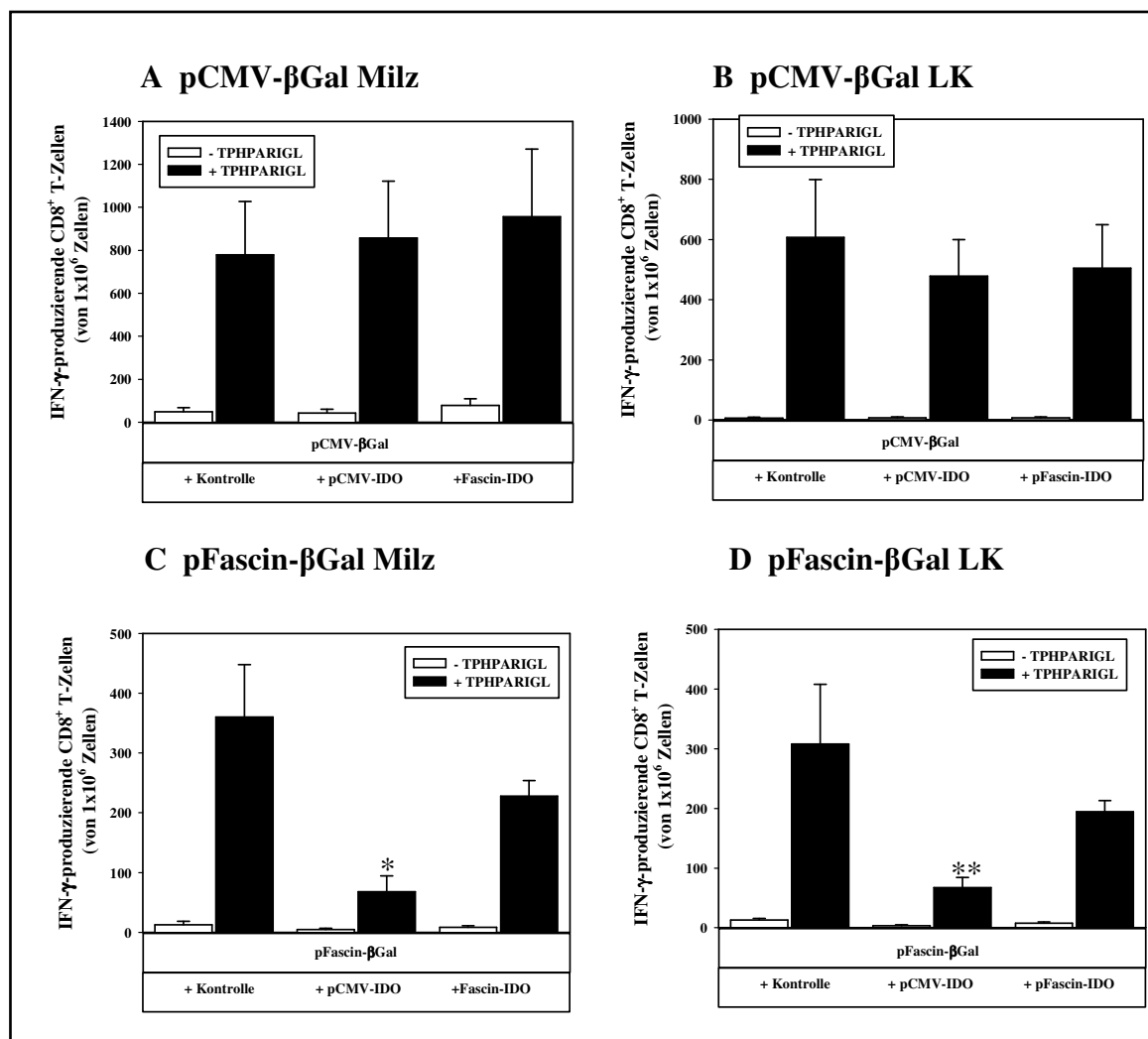
#### **3.3.4 Effekt einer biolistischen Koimmunisierung mit IDO kodierenden Plasmiden auf die Induktion transgenspezifischer IFN- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen**

Am Tag der Organentnahme wurde auch die Frequenz der IFN- $\gamma$ -produzierenden CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen unter den Milz- und Lymphknotenzellen bestimmt. In Abbildung 21 sind die Mittelwerte von zwei Experimenten mit jeweils 4 Mäusen pro Gruppe dargestellt.

Eine Koimmunisierung von pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid, pCMV-IDO und pFascin-IDO führte in der Milz und auch in den Lymphknoten zu einer Induktion von CD8<sup>+</sup> antigenspezifischen IFN- $\gamma$ -produzierenden T-Zellen. Diese war bei allen Plasmid-Kombinationen etwa gleich stark.

Nach einer DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal kam es insgesamt zur Induktion einer geringeren Anzahl CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen als nach Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal. Nach der Koapplikation von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pFascin-EGFP konnte die größte Anzahl IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen in Milz und Lymphknoten nachgewiesen werden. Diese war moderat reduziert nach einer Koimmunisierung mit pFascin-IDO im Vergleich zur Kontrollgruppe und signifikant reduziert nach Koapplikation von pCMV-IDO.

Somit konnte eine Reduktion der Anzahl IFN- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen nur nach einer DNA-Immunisierung mit einer Kombination von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO erreicht werden.



**Abb.21: Einfluss einer Koapplikation von pCMV- $\beta$ Gal bzw. pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IDO/pFascin-IDO auf die Induktion CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ -produzierender zytotoxischer T-Zellen** BALB/c Mäuse (n=8) wurden dreimal im Abstand von einer Woche, mit Hilfe der Genpistole, mit pCMV- $\beta$ Gal oder pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit einem Kontroll-Plasmid, pCMV-IDO oder pFascin-IDO immunisiert. 13 Tage nach der letzten Immunisierung wurden Milz- (A, C) und Lymphknotenzellen (B, D) isoliert und die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde mittels CTL-EliSpot ermittelt. Dazu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in An- (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) des  $\beta$ Gal-Peptides TPHPARIGL kultiviert. Nach 20 Stunden erfolgte die Auswertung des Tests. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei Experimenten. Signifikante Unterschiede der Induktion zytotoxischer T-Zellen von mit pFascin- $\beta$ Gal + pCMV-IDO immunisierten Tieren im Vergleich zu Mäusen, die mit pFascin- $\beta$ Gal + Kontroll-Vektor immunisiert wurden sind gekennzeichnet, (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ). Die Unterschiede aller anderen Gruppen bezogen auf die jeweilige Kontroll-Gruppe waren nicht signifikant.

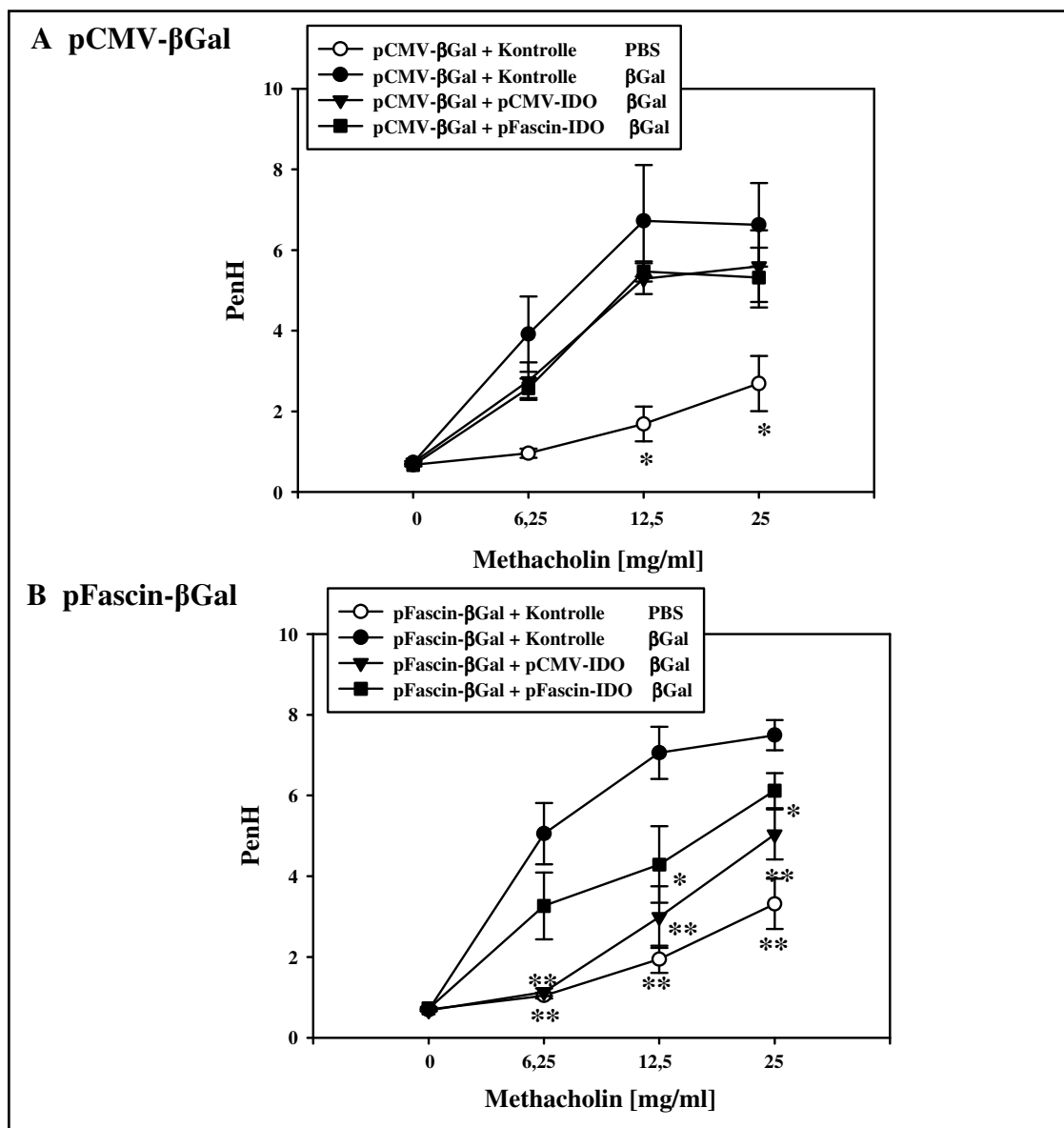
### 3.3.5 Effekt einer biolistischen Koimmunisierung mit IDO-kodierenden Plasmiden auf die Entstehung einer Atemwegshyperreaktivität

Wie in 3.1.1 beschrieben wurden BALB/c Mäuse dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit Hilfe der Genpistole mit pCMV- $\beta$ Gal oder pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pFascin-EGFP, pCMV-IDO oder pFascin-IDO immunisiert. Nach einer anschließenden dreimaligen intranasalen Provokation mit  $\beta$ Gal wurde die Atemwegsreaktivität gemessen. Als negative Kontrollgruppe dienten Mäuse, denen nach der Immunisierung intranasal PBS verabreicht wurde.

Abbildung 22A zeigt die Ergebnisse der Lungenfunktionsmessung für Mäuse, die mit pCMV- $\beta$ Gal immunisiert wurden und 22B für eine Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal. Dargestellt ist der PenH-Wert in Abhängigkeit von der Methacholindosis.

Bei den mit PBS behandelten Kontrolltieren kam es durch die Provokation mit Methacholin nur zu einem sehr schwachen Anstieg der gemessenen PenH-Werte. Diese waren signifikant niedriger im Vergleich zu den mit  $\beta$ Gal provozierten Mäusen. So wiesen die mit pCMV- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten und mit  $\beta$ Gal behandelten Mäuse im Vergleich dazu mit steigenden Methacholin-Dosen eine zunehmende Atemwegshyperreaktivität auf. Eine Koexpression von pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO bzw. pFascin-IDO führte nur zu einer moderat verminderten Atemwegshyperreaktivität im Vergleich zu der mit  $\beta$ Gal behandelten positiven Kontrollgruppe, wobei diese in beiden Gruppen in etwa gleich war.

Für die positive und negative Kontrollgruppe ergab sich nach einer DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal das gleiche Bild, wie nach Applikation von pCMV- $\beta$ Gal. Eine Behandlung der Tiere mit PBS führte nicht zu einem Anstieg der Atemwegsreaktivität. Die gemessenen Werte waren signifikant niedriger verglichen mit den positiven Kontrolltieren. So konnte bei den mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten und mit  $\beta$ Gal provozierten Tieren eine starke Atemwegshyperreaktivität gemessen werden. Eine biolistische Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und pFascin-IDO führte zu einer Reduktion der AHR im Vergleich zur Positivkontrolle, die bei einer Dosis von 12,5 und 25 mg/ml signifikant war. Eine Koimmunisierung mit pCMV-IDO führte zu einer noch weiter gesteigerten Reduktion der Atemwegsreaktivität, die bei allen verwendeten Methacholin-Dosen signifikant war, und bei einer Konzentration von 6,25 mg/ml auf dem Niveau der mit PBS behandelten Tiere lag.



**Abb.22: Einfluss einer Koapplikation von pCMV-βGal bzw. pFascin-βGal und pCMV-IDO/pFascin-IDO auf die Entwicklung einer Atemwegshyperreaktivität nach intranasaler Provokation mit βGal BALB/c-Mäuse** (pCMV-βGal: n=4, pFascin-βGal: n=8) wurden mit pCMV-βGal bzw. pFascin-βGal zusammen mit pFascin-EGFP, pCMV-IDO oder pFascin-IDO mit Hilfe der Genpistole immunisiert und im Anschluss daran, ab Tag 24 dreimal im Abstand von 24 h mit βGal intranasal provoziert, bzw. zur Kontrolle mit PBS behandelt. Im Anschluss daran wurde eine nicht-invasive Messung der Atemwegshyperreaktivität im Ganzkörper-Plethysmographen durchgeführt. Dabei wird bei steigender Methacholin-Dosis (3,125, 6,25, 12,5, 25 mg/ml) die Lungenfunktion gemessen. In der Graphik ist der gemessene PenH-Wert als Maß für die Atemwegsreaktivität abgebildet. Als Vergleichswert für die Steigung der Atemwegsreaktivität dient der PenH-Wert ohne Gabe von Methacholin. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von einem (pCMV-βGal) bzw. zwei (pFascin-βGal) Experimenten mit jeweils 4 Mäusen pro Experiment und Gruppe. Signifikante Unterschiede der prozentualen Abweichung von der Basislinie von Mäusen, die mit pCMV-βGal/pFascin-βGal + Kontrolle immunisiert und mit PBS intranasal behandelt wurden (schwarze Kreise) im Vergleich zu Tieren, die mit den gleichen Plasmiden immunisiert und mit βGal provoziert wurden (weiße Kreise) und denen, die mit pCMV-IDO (weiße Dreiecke) bzw. pFascin-IDO (schwarze Vierecke) immunisiert wurden, sind gekennzeichnet (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ )



Einhergehend mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen, nämlich einer Reduktion der antigenspezifischen IgG-Produktion und einer verringerten Zytokin-Produktion, kommt es somit nach der Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO zu einer Inhibition der Atemwegshyperreaktivität nach intranasaler Provokation mit  $\beta$ Gal im Vergleich zu den mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten und mit  $\beta$ Gal behandelten Kontrolltieren. Im Fall einer Koimmunisierung mit pFascin-IDO war diese Inhibition nur in einem geringeren Ausmaß zu beobachten. Die Inhibition war in allen durchgeführten Experimenten bei einer Koimmunisierung mit pCMV-IDO stärker als mit pFascin-IDO.

### **3.3.6 Effekt einer biolistischen Koimmunisierung mit IDO-kodierenden Vektoren auf die zelluläre Zusammensetzung der bronchoalveolären Flüssigkeit**

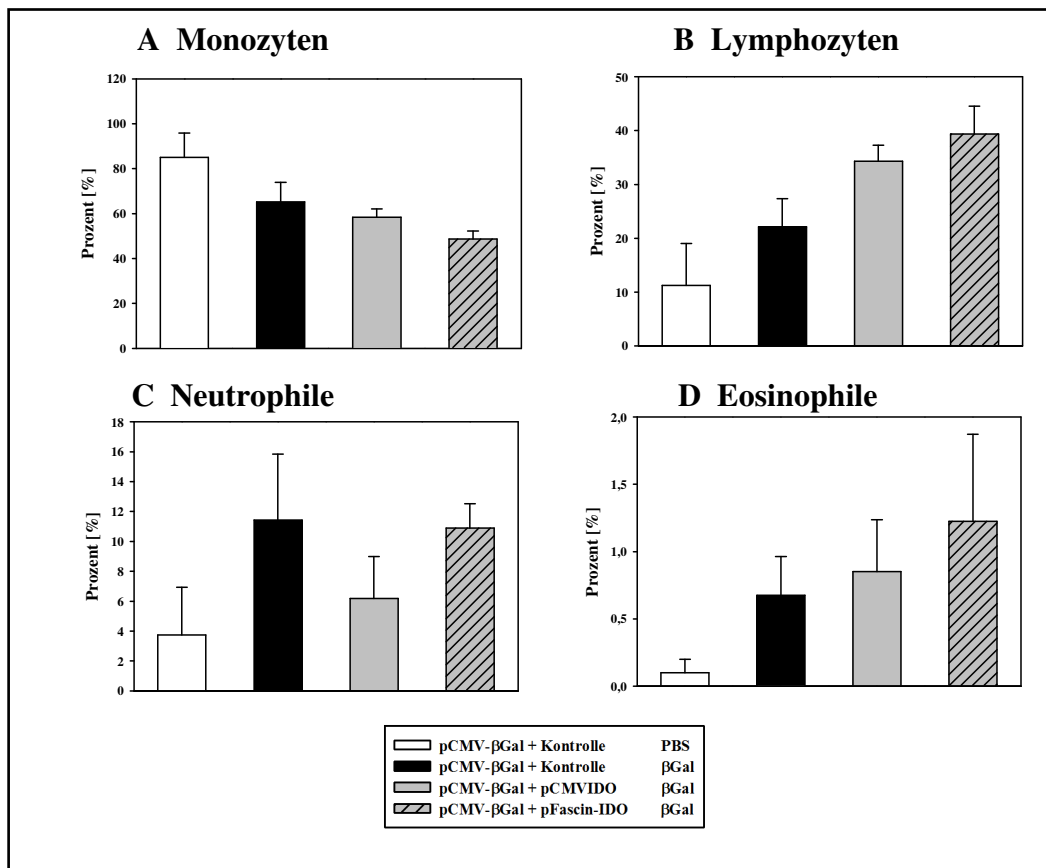
Im Anschluss an die Messung der Atemwegsreaktivität wurde am Tag darauf eine Lungenspülung durchgeführt. Die zelluläre Zusammensetzung der BAL wurde nach der Anfertigung und Anfärbung von Zytospin-Präparaten mit Hilfe einer Diff-Quick®-Färbung analysiert. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Tiere gezeigt, die mit pCMV- $\beta$ Gal koimmunisiert wurden und in Abbildung 24 die Resultate der mit pFascin- $\beta$ Gal immunisierten Mäuse.

In den mit PBS behandelten Kontrolltieren waren Monozyten die am häufigsten vorkommenden Zellen. Alle anderen Zelltypen waren nur zu einem geringen Anteil nachweisbar. Eine intranasale Provokation mit  $\beta$ Gal führte zu einer Reduktion des prozentualen Anteils an Monozyten und zu einem vermehrten Vorkommen von Lymphozyten, vor allem aber auch von neutrophilen Granulozyten. Die Anzahl an Eosinophilen war ebenfalls erhöht. Diese Zellen waren allerdings insgesamt nur zu einem sehr geringen Anteil in den Lungen der Mäuse nachweisbar. Eine Koimmunisierung mit pCMV-IDO führte ebenfalls zu einem verminderten Anteil an Monozyten verglichen mit der Negativkontrolle. Der Anteil an Lymphozyten war erhöht im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen. Der prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten war vermindert verglichen mit den mit  $\beta$ Gal provozierten Kontrolltieren, lag aber noch über den Werten der negativen mit PBS behandelten Kontrollmäuse. Der Anteil an Eosinophilen war leicht erhöht

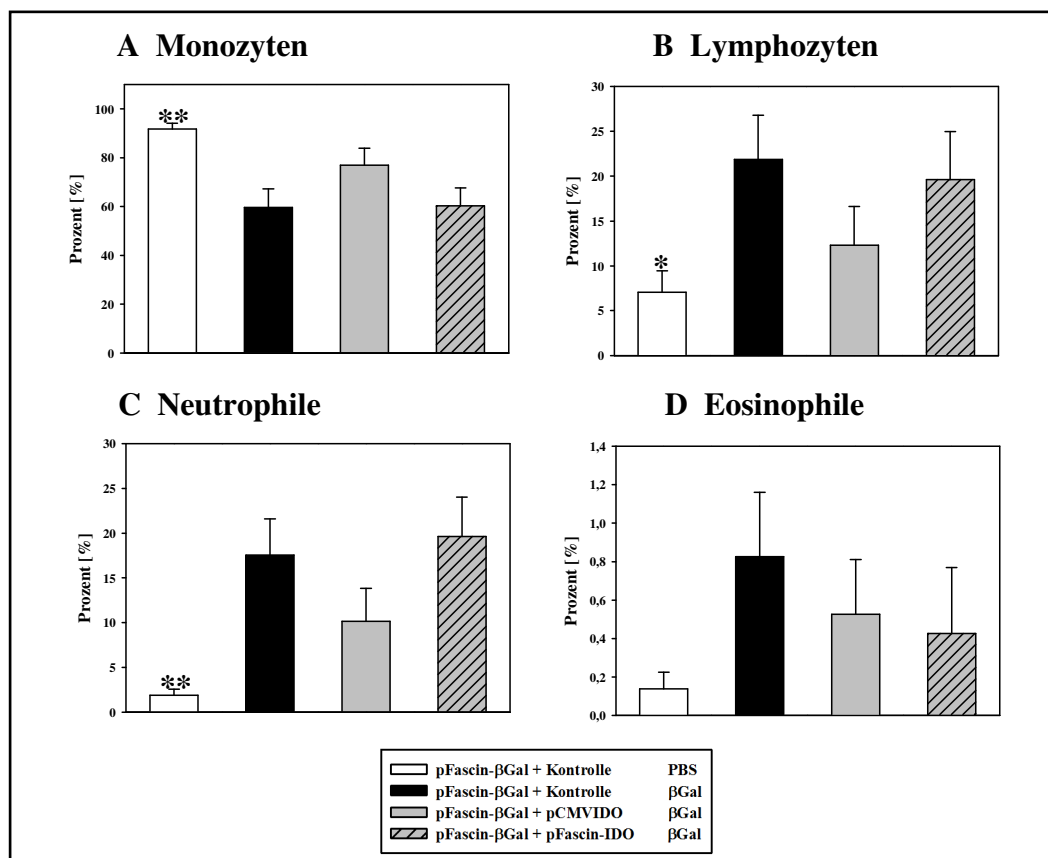
im Vergleich zu der Positivkontrolle, lag aber noch unter einem Prozent. Nach der Koapplikation von pFascin-IDO konnte ein verminderter Anteil an Monozyten und etwa gleich viele Neutrophile wie bei den positiven Kontrollmäusen nachgewiesen werden. Der Anteil an Lymphozyten und Eosinophilen hingegen war erhöht, wobei auch hier nur eine sehr geringe Anzahl an eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden konnte.

Auch nach einer Koapplikation von pFascin- $\beta$ Gal und pFascin-EGFP gefolgt von einer intranasalen Gabe von PBS war im Vergleich zu den anderen Gruppen der höchste Anteil an Monozyten nachweisbar. Dieser lag signifikant über dem der mit  $\beta$ Gal provozierten Kontrolltiere. In den Lungen dieser Tiere konnten auch Lymphozyten, Neutrophile und Eosinophile nachgewiesen werden, allerdings nur zu einem sehr geringen prozentualen Anteil, der im Fall der Lymphozyten und Neutrophilen signifikant unter dem der positiven Kontrolltiere lag. Die Provokation mit  $\beta$ Gal führte zu einem vermehrten Vorkommen von Lymphozyten und Neutrophilen und damit einhergehend zu einem verminderten Anteil an Monozyten. Eosinophile waren auch nachweisbar, allerdings nur zu einem sehr geringen prozentualen Anteil. Die Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO führte zu einer Verminderung des Anteils an Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen im Vergleich zu den positiven Kontrollmäusen. Der Anteil an Monozyten war in dieser Gruppe wiederum erhöht. Dieser Effekt war nach der Kovakzinierung mit pFascin-IDO nicht zu beobachten. Hier konnte etwa der gleiche Anteil an Neutrophilen nachgewiesen werden wie bei den mit  $\beta$ Gal behandelten Kontrolltieren. Die Lymphozytenzahl hingegen war weiterhin erhöht, ebenso wie der Anteil von Eosinophilen Granulozyten. Dieser war allerdings immer noch sehr gering. In den Lungen dieser Mäuse konnten weniger Monozyten nachgewiesen werden als bei der Positivkontrolle.

Einhergehend mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen der stärksten Reduktion der Atemwegshyperreaktivität nach Koimmunisierung von pFascin $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO kommt es somit auch zu einem geringeren prozentualen Anteil an allergeninduzierten neutrophilen Granulozyten, nach intranasaler Provokation mit  $\beta$ Gal, im Vergleich zu den mit dem pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten und mit  $\beta$ Gal behandelten Kontrolltieren. Nach einer Koimmunisierung von pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO war ebenfalls auch eine Reduktion des Anteils an Neutrophilen nachweisbar, wenngleich hier die beobachtete Inhibition der Atemwegsreaktivität nicht so stark war.



**Abb. 23 Einfluss einer Koapplikation von pCMV-βGal und pCMV-IDO/pFascin-IDO auf die prozentuale Zusammensetzung der Zellen in der BAL** BALB/c-Mäuse (n=4) wurden mit pCMV-βGal + pCMV-IDO (graue Balken), pCMV-βGal + pFascin-IDO (grau schraffierte Balken) oder pCMV-βGal + Kontroll-Plasmid immunisiert und anschließend mit βGal provoziert (schwarze Balken) bzw. mit PBS zur Kontrolle behandelt (weiße Balken). 2 Tage nach der letzten Provokation wurde eine Spülung der Lungen durchgeführt und anschließend  $5 \times 10^5$  Zellen mit Hilfe einer Zytospin-Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht und einer Diff-Quick®-Färbung unterzogen. Mikroskopisch wurden die Zellen anhand der Morphologie und des Färbeverhaltens charakterisiert und ausgezählt. Hierbei wurden Monozyten (A), Lymphozyten (B), Neutrophile (C) und Eosinophile (D) unterschieden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von einem Experiment. Die Unterschiede der Gruppen zueinander waren nicht signifikant.



**Abb. 24: Einfluss einer Koapplikation von pFascin-βGal und pCMV-IDO/pFascin-IDO auf die prozentuale Zusammensetzung der Zellen in der BAL** BALB/c-Mäuse (n=8) wurden mit pFascin-βGal + pCMV-IDO (graue Balken), pFascin-βGal + pFascin-IDO (grau schraffierte Balken) oder pFascin-βGal + Kontroll-Plasmid immunisiert und anschließend mit βGal provoziert (schwarze Balken) bzw. mit PBS zur Kontrolle behandelt (weiße Balken). 2 Tage nach der letzten Provokation wurde eine Spülung der Lungen durchgeführt und anschließend  $5 \times 10^5$  Zellen mit Hilfe einer Zytospin-Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht und einer Diff-Quick®-Färbung unterzogen. Mikroskopisch wurden die Zellen anhand der Morphologie und des Färbeverhaltens charakterisiert und ausgezählt. Hierbei wurden Monozyten (A), Lymphozyten (B), Neutrophile (C) und Eosinophile (D) unterschieden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei Experimenten. Signifikante Unterschiede des prozentualen Anteils in Zellen der mit PBS behandelten Tiere im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe sind gekennzeichnet (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ). Die Unterschiede zwischen den mit IDO immunisierten Tieren und den mit pFascin-βGal + Kontrolle immunisierten und mit β-Gal behandelten Tieren Mäusen waren nicht signifikant.

Zusammenfassend führte eine biolistische DNA-Immunisierung mit pFascin-βGal in Kombination mit pCMV-IDO zu einer effektiven Inhibition der antigenspezifischen Immunantwort, charakterisiert durch eine Inhibition der antigenspezifischen IgG-Titer, einer Inhibition der Zytokinproduktion und auch einer Reduktion der Atemwegshyperreaktivität

assoziiert mit einer Reduktion der neutrophilen Granulozyten. Die Koimmunisierung mit pFascin-IDO war weniger effektiv im Vergleich zur Verwendung von IDO unter Kontrolle des CMV-Promotors.

Eine Koimmunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit den IDO-kodierenden Plasmiden hatte hingegen keine Inhibition der  $\beta$ Gal-spezifischen Immunantwort zur Folge.

### **3.3.7 Untersuchung zur Induktion regulatorischer T-Zellen nach biolistischen Koimmunisierung mit IDO kodierenden Plasmiden**

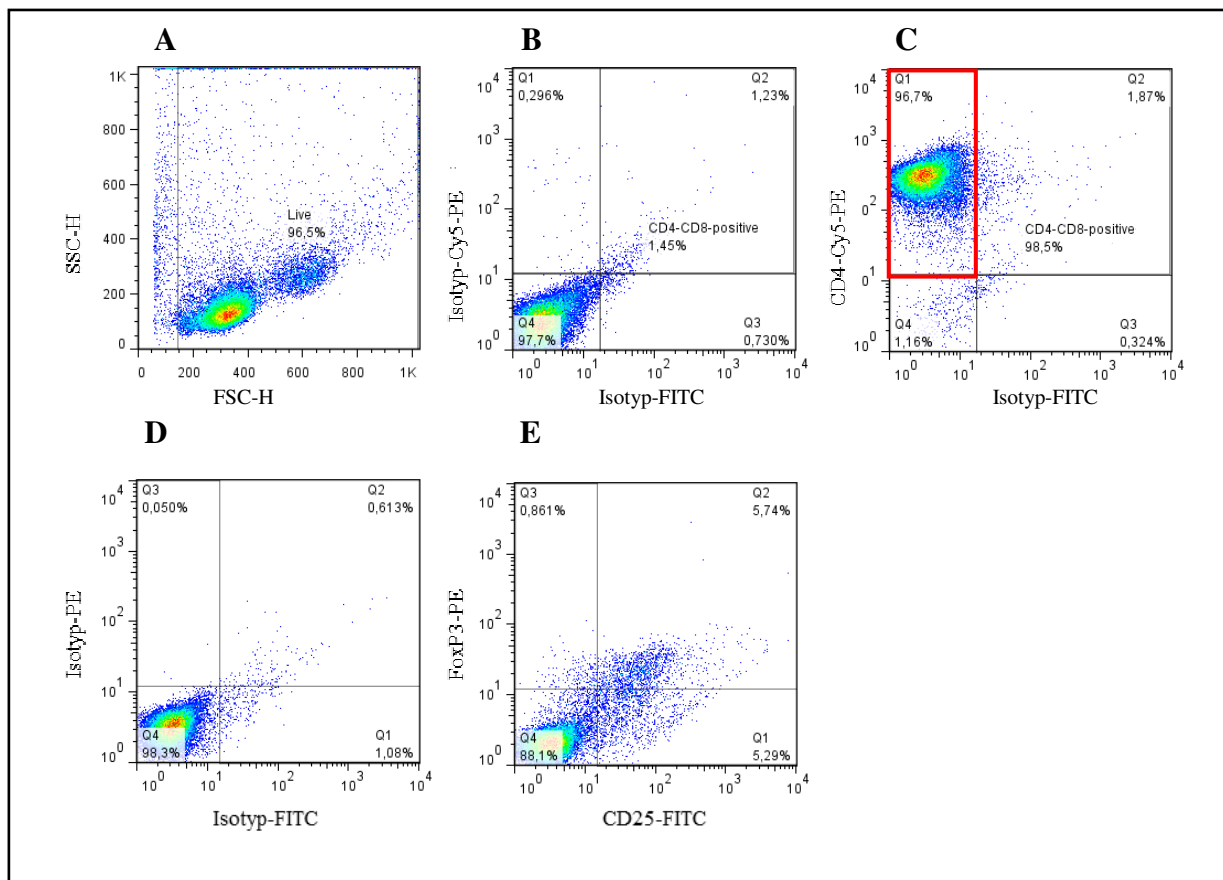
Als nächstes sollte untersucht werden, ob die durch eine biolistische Koimmunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IDO induzierte Inhibition der allergenspezifischen Immunantwort durch regulatorische T-Zellen (Treg) vermittelt wird. Diese könnten aufgrund der IDO-Expression induziert werden.

Hierzu wurden BALB/c-Mäuse dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit Hilfe der Genpistole mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid oder pCMV-IDO immunisiert. Als Kontrolle für die Anzahl von Tregs in Mäusen, die nicht behandelt wurden, dienten unbehandelte naive Mäuse. Anschließend wurden die drainierenden Lymphknoten und die Milzen der Mäuse isoliert und die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den Organen wurden mit Hilfe der MACS-Technologie separiert. Die Frequenz der regulatorischen T-Zellen wurde anhand der Expression von CD25 und des für regulatorische T-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktors FoxP3 auf den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Des Weiteren erfolgte ein Nachweis der RNA von FoxP3 sowie der immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  mittels Realtime-PCR.

Nach Aufreinigung der T-Zellen mit Hilfe der magnetischen Zellseparation wurde die Reinheit der Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Während die isolierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den Lymphknoten sowie die CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz nach der Zellseparation eine Reinheit von 90 bis 99 % aufwiesen, betrug die Reinheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz zwischen 60 und 86 %.

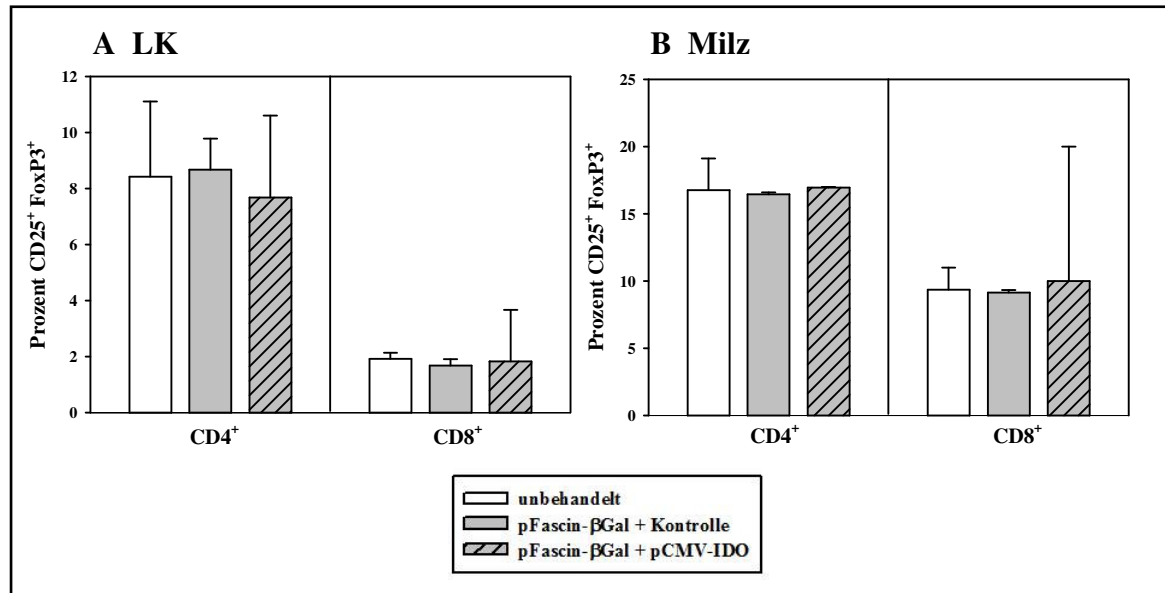
In Abbildung 25 ist exemplarisch die Auswertungsstrategie zur Bestimmung der Frequenz CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Zellen unter den CD4<sup>+</sup> separierten Zellen dargestellt. Mit eingeschlossen in

die Abbildung sind die für die jeweilige Färbung verwendeten Isotyp-Kontrollen. In Abbildung 25A ist dargestellt, dass nur die lebenden Zellen in die Analyse eingeschlossen wurden. Anhand der Isotyp-Kontrolle (B) wurden die CD4<sup>+</sup> und analog auch die CD8<sup>+</sup> Zellen ermittelt (C) und nur diese Zellen wurden für die weitere Untersuchung der CD25- und FoxP3-Expression berücksichtigt. Innerhalb der Population der CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Zellen wurde aufgrund der entsprechenden Färbung die Anzahl der CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen analysiert (E). In D ist die dazugehörige Isotyp-kontrolle dargestellt.



**Abb. 25: Auswertungsstrategie zur Bestimmung der Frequenz CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatorischer Zellen**  
 Aus den axillären und inguinalen Lymphknoten sowie den Milzen der Versuchstiere wurden mittels magnetischer Zellseparation die CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert. Im Anschluss wurden diese mittels der Durchflusszytometrie im Hinblick auf die Expression von CD4 bzw. CD8 sowie CD25 und FoxP3 charakterisiert. Dazu wurden innerhalb der Population der lebenden Zellen (A) mit Hilfe der Isotyp-Kontrolle (B) die CD4- bzw. CD8-positiven T-Zellen eingegrenzt (C). Innerhalb dieser Population wurde mit Hilfe einer Isotypkontrolle (D) die Frequenz der CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt (E).

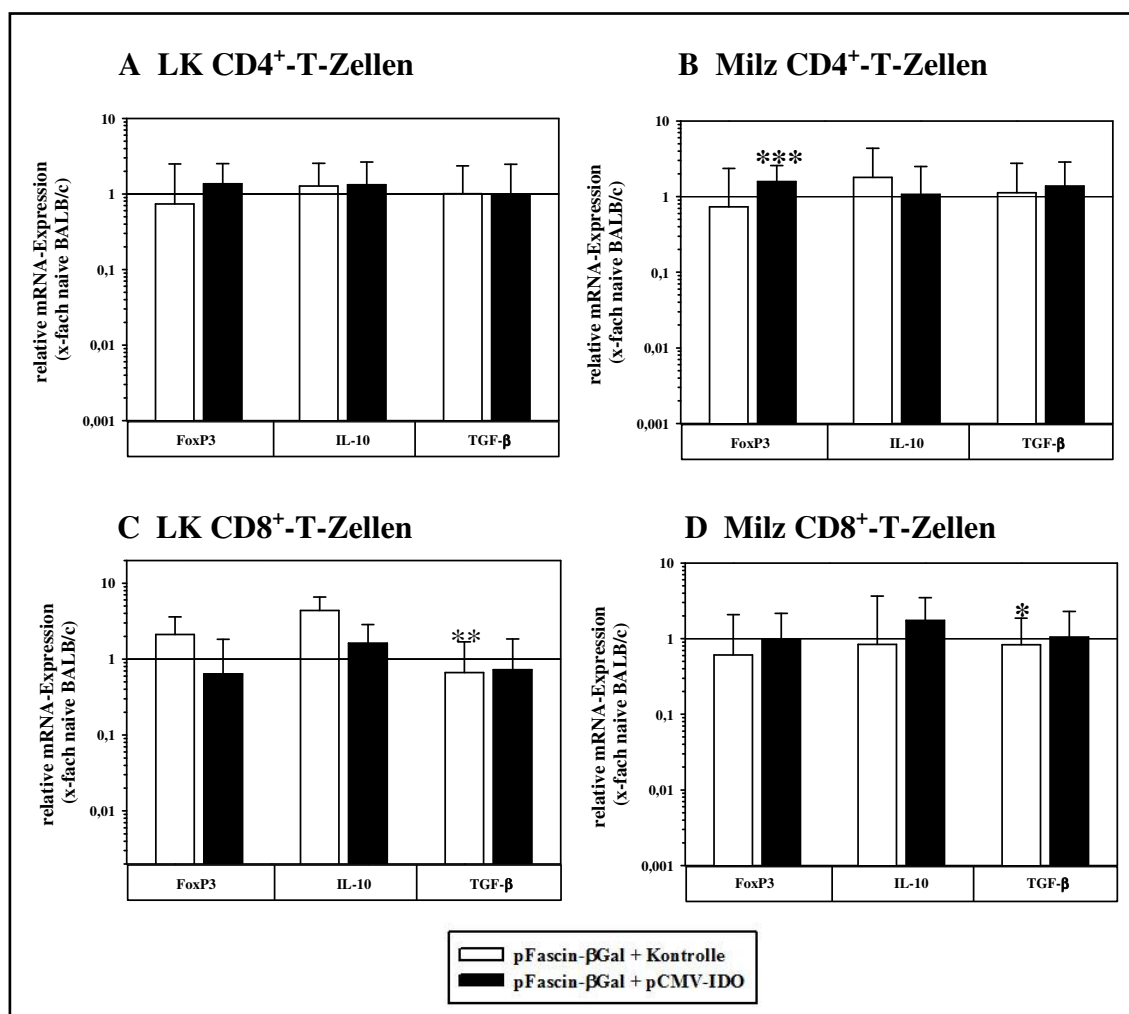
Die prozentualen Anteile der  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  bzw. der  $CD8^+CD25^+FoxP3^+$  Zellen innerhalb der Population der drainierenden Lymphknotenzellen oder Milzzellen aus biolistisch transfizierten Mäusen sowie aus naiven Kontrollmäusen sind in Abbildung 26 graphisch dargestellt. Es konnte keine signifikante Erhöhung der Anzahl  $CD25^+FoxP3^+$  regulatorischer T-Zellen nachgewiesen werden.



**Abb. 26: Durchflusszytometrische Analyse des Frequenzen  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  bzw.  $CD8^+CD25^+FoxP3^+$  regulatorischer T-Zellen nach biolistischer Transfektion mit IDO kodierenden Vektoren** BALB/c Mäuse (n=6) wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit pFascin-βGal + Kontroll-Plasmid oder pFascin-βGal + pCMV-IDO mit 10 µg jedes Plasmids immunisiert. Als Kontrolle für das Vorkommen von Tregs in nicht vakzinierten Tieren dienten unbehandelte Mäuse. Im Anschluss an die Immunisierung wurden die axillären und inguinalen Lymphknoten (A) und die Milzen (B) entnommen. Mittels magnetischer Zellseparation wurden die  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen isoliert und die Expression von CD4, CD8, CD25 bzw. FoxP3 in den T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der prozentualen Anteile  $CD25^+FoxP3^+$  T-Zellen zweier Experimente. Die Unterschiede in den Frequenzen der Gruppen waren nicht signifikant.

Zusätzlich wurde die Expression der mRNA für FoxP3 sowie der regulatorischen Zytokine IL-10 und TGF-β in den  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  T-Zellen, die aus den Lymphknoten und Milzen der biolistisch transfizierten Versuchsmäuse isoliert wurden, bestimmt (Abb. 27). Die mRNA-Expression der Moleküle FoxP3, IL-10 und TGF-β wurde mittels Realtime-PCR im Vergleich zu dem Haushaltsgen GAPDH bestimmt. Die mRNA-Expression in T-Zellen der mit pFascin-βGal und dem Kontroll-Plasmid bzw. pCMV-IDO immunisierten Tiere wurde hierbei auf die mRNA-Expression der jeweiligen Moleküle in unbehandelten Mäusen bezogen. Die

Bestimmung der mRNA-Expression ergab keine signifikante Erhöhung der mit regulatorischen T-Zellen assoziierten getesteten Marker.



**Abb. 27: Analyse der mRNA-Expression verschiedener mit Toleranz assoziierter Moleküle nach biolistischer Transfektion mit IDO-kodierenden Vektoren** BALB/c Mäuse (n=6) wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit pFascin-βGal + Kontroll-Plasmid (weiße Balken) oder pFascin-βGal + pCMV-IDO (schwarze Balken) mit 10 µg jedes Plasmids immunisiert. Als Kontrolle zur Detektion der Genexpression in unvakzinierten Tieren dienten unbehandelte Mäuse. Im Anschluss an die Immunisierung wurden die axillären und inguinalen Lymphknoten und die Milzen entnommen. Mittels magnetischer Zellseparation wurden die CD4<sup>+</sup> (A: Lymphknoten, B: Milz) bzw. die CD8<sup>+</sup> T-Zellen (C: Lymphknoten, D: Milz) isoliert und die mRNA-Expression der Moleküle FoxP3, IL-10 und TGF-β wurde mittels Realtime-PCR im Vergleich zu dem Haushaltsgen GAPDH bestimmt. Die mRNA-Expression der aufgereinigten T-Zellen aus naiven BALB/c-Mäusen wurde gleich 1 gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardfehler der Expressionsdaten aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Tieren sind gekennzeichnet (\* p ≤ 0,05, \*\* p ≤ 0,01, \*\*\* p ≤ 0,001). Die Unterschiede zwischen den biolistisch immunisierten Tieren waren nicht signifikant.



Die durchflusszytometrische Charakterisierung und die mRNA-Expressionsanalysen lieferten keinen Hinweis auf eine verstärkte Induktion CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen durch eine DNA-Immunisierung mit IDO-kodierender Plasmid-DNA. Daher wurde zusätzlich in der nächsten Versuchsreihe funktionell getestet, ob durch eine DNA-Immunisierung mit IDO kodierenden Vektoren eventuell T-Zellen mit regulatorischer Aktivität entstehen.

### **3.4 Prophylaktische Vakzinierung mit IDO-kodierender Plasmid-DNA im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung**

Um funktionell zu überprüfen, ob infolge einer DNA-Vakzinierung mit IDO-kodierenden Vektoren regulatorische T-Zellen entstehen, die einen inhibierenden Effekt auf die durch eine nachfolgende Proteinsensibilisierung induzierte Th2-Antwort haben, wurden BALB/c Mäuse dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit Hilfe der Genpistole immunisiert und im Anschluss, wie in 3.2.1 beschrieben, mit  $\beta$ Gal-Protein sensibilisiert. Als Kontrolle für die durch eine Proteinsensibilisierung induzierte Immunantwort dienten Tiere, die nur mit dem Protein sensibilisiert wurden. Aufgrund der unter 3.3 geschilderten Ergebnisse, dass sich nur bei Beschränkung der Transgenexpression auf DCs durch IDO-kodierende Vektoren eine Inhibition der antigenspezifischen Immunantwort herbeiführen lässt, wurde die Kovakzinierung nur mit pFascin- $\beta$ Gal als antigenkodierendem Plasmid durchgeführt. Der antigenspezifische IgG-Titer im Serum der Mäuse wurde bestimmt, die Zytokin-Produktion von Milz- und Lymphknotenzellen ermittelt, die Atemwegshyperreaktivität nach intranasaler Provokation mit  $\beta$ Gal gemessen, Tests zur Induktion CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ -produzierender T-Zellen durchgeführt und die Zusammensetzung der bronchoalveolären Lavage und die Zytokin-Konzentrationen darin bestimmt.

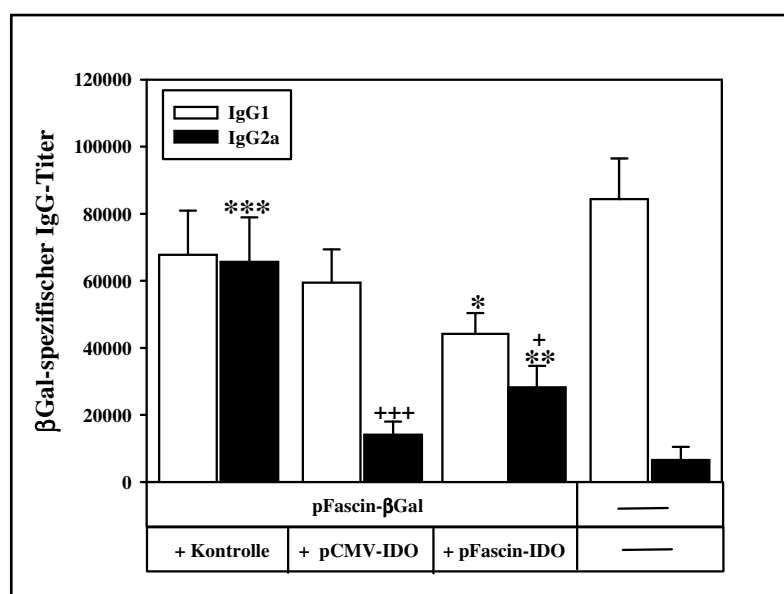
### **3.4.1 Effekt einer prophylaktischen Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal und IDO-kodierenden Vektoren auf die durch eine Proteinsensibilisierung induzierte IgG-Produktion**

Nach der initialen Vakzinierungsphase mit der Genpistole wurde zunächst überprüft, ob die Immunisierung erfolgreich war. Hierzu wurden im Serum der biolistisch transfizierten Mäuse die antigenspezifischen IgG1- und IgG2a-Titer bestimmt. Hierbei bestätigten sich die bereits in 3.3.2 gezeigten Ergebnisse. Eine DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pFascin-EGFP induzierte die Produktion von IgG2a. Durch die Koimmunisierung mit pCMV-IDO war der IgG2a-Titer im Vergleich dazu signifikant vermindert. Die Kovakzinierung mit pFascin-IDO hingegen hatte nicht diesen inhibierenden Effekt.

Im Anschluss an die Vakzinierung erfolgte die Sensibilisierungsphase, die aus einer dreimaligen subkutanen Injektion von  $\beta$ Gal-Protein im Abstand von jeweils einer Woche bestand. Nach der letzten Sensibilisierung erfolgte eine erneute Blutentnahme zur Analyse des  $\beta$ Gal-spezifischen IgG1 und IgG2a.

Wie in Abbildung 28 gezeigt ist, wurde in den nicht vakzinierten Kontrollmäusen durch die Proteinsensibilisierung hauptsächlich die Produktion von IgG1-Antikörpern induziert, was auf eine durch Th2-Zellen vermittelte Immunantwort hindeutet. IgG2a war hingegen nur in geringen Mengen zu detektieren. Die DNA-Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit dem Kontroll-Vektor führte zu einer signifikanten Steigerung der IgG2a-Produktion und zu einer deutlichen, aber statistisch nicht signifikanten Abnahme der IgG1-Produktion. Bei diesen Tieren konnte in etwa so viel IgG2a wie IgG1 im Serum nachgewiesen werden. Die Menge an IgG1 war im Serum der Tiere, die mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IDO immunisiert wurden vergleichbar mit der von Tieren, die mit dem Kontroll-Plasmid koimmunisiert wurden. Die Konzentration an IgG2a hingegen war verglichen mit der biolistisch immunisierten Kontrollgruppe signifikant geringer. Der IgG1-Titer der mit pFascin- $\beta$ Gal und pFascin-IDO koimmunisierten Tiere lag unter dem der beiden anderen biolistisch immunisierten Gruppen und war signifikant reduziert verglichen mit den Tieren, die nur mit dem Protein sensibilisiert wurden. IgG2a hingegen war signifikant erhöht verglichen mit diesen Tieren. Verglichen mit den Tieren, die mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisiert wurden war IgG2a signifikant reduziert.

Zusammengefasst führt eine biolistische DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zu einer Inhibition der durch eine Proteinsensibilisierung induzierten IgG1-Produktion im Serum. Es kommt allerdings zu einer vermehrten Bildung von IgG2a, die durch eine Koapplikation mit CMV- und Fascin-IDO inhibiert werden kann. Hierbei hatte die Verwendung von IDO unter Kontrolle des CMV-Promotors einen stärkeren Effekt auf die Inhibition der IgG2a-Produktion.



**Abb. 28: Einfluss einer protektiven DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und IDO-kodierenden Vektoren auf die Antikörperproduktion im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung** BALB/c Mäuse (n=16-32) wurden dreimal im Abstand von einer Woche mit pFascin- $\beta$ Gal und einem Kontroll-Plasmid, pCMV-IDO oder pFascin-IDO mit der Genpistole immunisiert. Anschließend wurden den Mäusen dreimal im Abstand von einer Woche 10  $\mu$ g  $\beta$ Gal subkutan injiziert. Zur Kontrolle wurden Tiere nur mit dem Protein sensibilisiert. Vier bis fünf Tage nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und das  $\beta$ Gal-spezifische IgG1 und IgG2a im Serum wurde mittels ELISA nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der IgG-Titer individueller Seren. Signifikante Unterschiede zwischen biolistisch immunisierten Tieren und Kontrollmäusen, die lediglich mit dem Protein sensibilisiert wurden, sind gekennzeichnet, (\* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Signifikante Unterschiede zwischen Tieren, die mit IDO kodierenden Plasmiden oder dem Kontroll-Plasmid vakziniert wurden, sind gekennzeichnet (\* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ).

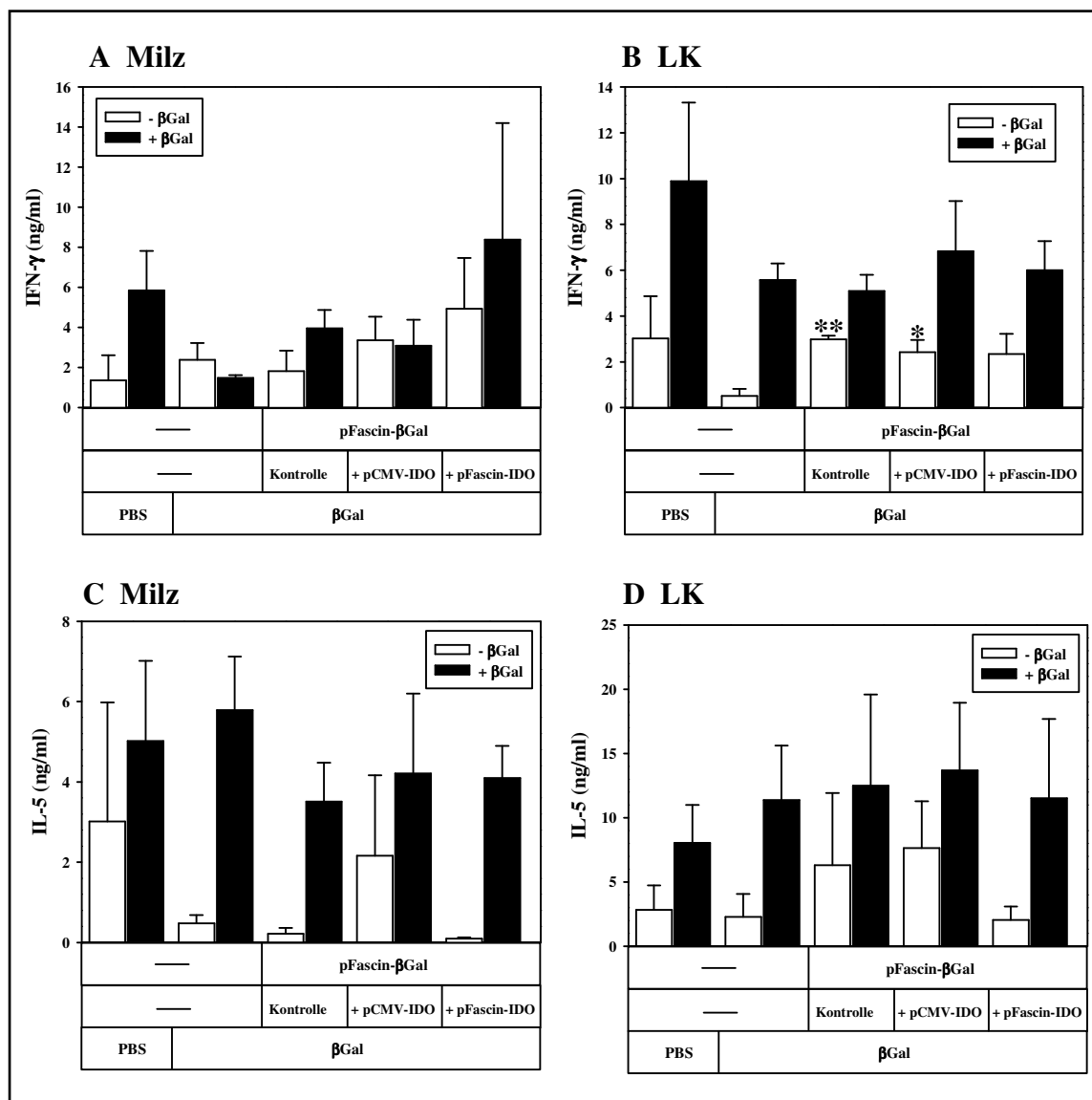
### **3.4.2 Effekt einer prophylaktischen Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal und IDO-kodierenden Vektoren auf die antigenspezifische Zytokinproduktion**

Die wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben behandelten Mäusen wurden dreimal intranasal mit  $\beta$ Gal behandelt und im Anschluss an die intranasale Provokation die die Atemwege drainierenden bronchialen und mediastinalen Lymphknoten sowie die Milz entnommen. Die daraus gewonnenen Zellen wurden 72 Stunden in An- und Abwesenheit von  $\beta$ Gal kultiviert und die durch die Zellen produzierten Zytokine wurden im Kulturüberstand mittels ELISA quantifiziert (Abb.29).

In den Kulturüberständen der Milz- und Lymphknotenzellen von Kontrollmäusen, die mit Protein sensibilisiert und abschließend mit PBS intranasal behandelt wurden, war eine deutliche IFN- $\gamma$ -Produktion nachweisbar. Diese war verglichen damit vermindert in den proteinsensibilisierten Tieren, die  $\beta$ Gal intranasal verabreicht bekamen. In den Milzen dieser Tiere war die insgesamt geringste Konzentration an IFN- $\gamma$  nachweisbar. In den Überständen der Lymphknotenzellen lag sie in etwa auf dem gleichen Level der Gruppen, die zuvor mit Plasmid-DNA immunisiert wurden. Eine DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid führte zu einer leicht erhöhten antigenspezifischen IFN- $\gamma$ -Produktion in den stimulierten Milzzellen im Vergleich zur den Tieren, die  $\beta$ Gal subkutan verabreicht bekamen und mit  $\beta$ Gal intranasal behandelt wurden. In den stimulierten Lymphknotenüberständen hingegen war die IFN- $\gamma$ -Konzentration im Vergleich zur proteinsensibilisierten Positivkontrolle nicht verändert. In den unstimulierten Überständen hingegen war sie signifikant erhöht. Die protektive Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IDO hatte keinen Effekt auf die IFN- $\gamma$ -Produktion in den Milzen verglichen mit den biolistisch immunisierten Kontrolltieren. Bei diesen Tieren war allerdings die Konzentration an IFN- $\gamma$  in den Überständen unstimulierter und stimulierter Zellen in etwa gleich. In den Lymphknoten dieser Tiere konnte verglichen mit der proteinsensibilisierten Positivkontrolle aber auch im Vergleich zu den biolistisch immunisierten Tieren eine vermehrte Produktion von IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden. In den Milzen der Tiere, die mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pFascin-IDO immunisiert wurden, konnte war die Konzentration an IFN- $\gamma$  von allen Gruppen am höchsten. In den Lymphknotenüberständen lag die Konzentration geringfügig über der ermittelten Konzentration der proteinsensibilisierten Positivkontrolle und der vakzinierter Kontrolle, war aber moderat vermindert verglichen mit den Tieren, die mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IDO behandelt wurden.

Das Th2-spezifische Zytokin IL-5 konnte in den Milz- und Lymphknotenüberständen der Mäuse, die ausschließlich mit dem Protein behandelt wurden und PBS intranasal verabreicht bekamen in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Menge an IL-5 in den Überständen der mit  $\beta$ Gal behandelten Positivkontrolle war verglichen damit moderat erhöht. Eine prophylaktische DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid führte in den Milzen zu einer verminderten IL-5 Produktion in den Lymphknoten hingegen zu einer moderaten Steigerung der IL-5-Konzentration verglichen mit der proteinsensibilisierten Kontrolle. Durch die Koapplikation von pCMV-IDO war die IL-5-Konzentration in Milz und Lunge gesteigert. Die gemessenen Werte lagen in der Milz aber noch unter denen der proteinsensibilisierten Positivkontrolle. Die prophylaktische Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal und pFascin-IDO führte in der Milz zu einer moderaten Erhöhung der IL-5 Produktion verglichen mit den vakzinieren Kontrollen in den Lymphknotenüberständen hingegen zu einer geringfügig reduzierten Konzentration an IL-5.

Eine Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit einem Kontroll-Plasmid, und auch eine Koimmunisierung mit pCMV-IDO oder pFascin-IDO, gefolgt von einer Proteinsensibilisierung führten damit zu einer antigenspezifischen Produktion des Th2 Zytokins IL-5. Diese waren nicht statistisch signifikant verändert im Vergleich zu den Tieren, die nur mit dem Protein sensibilisiert wurden.



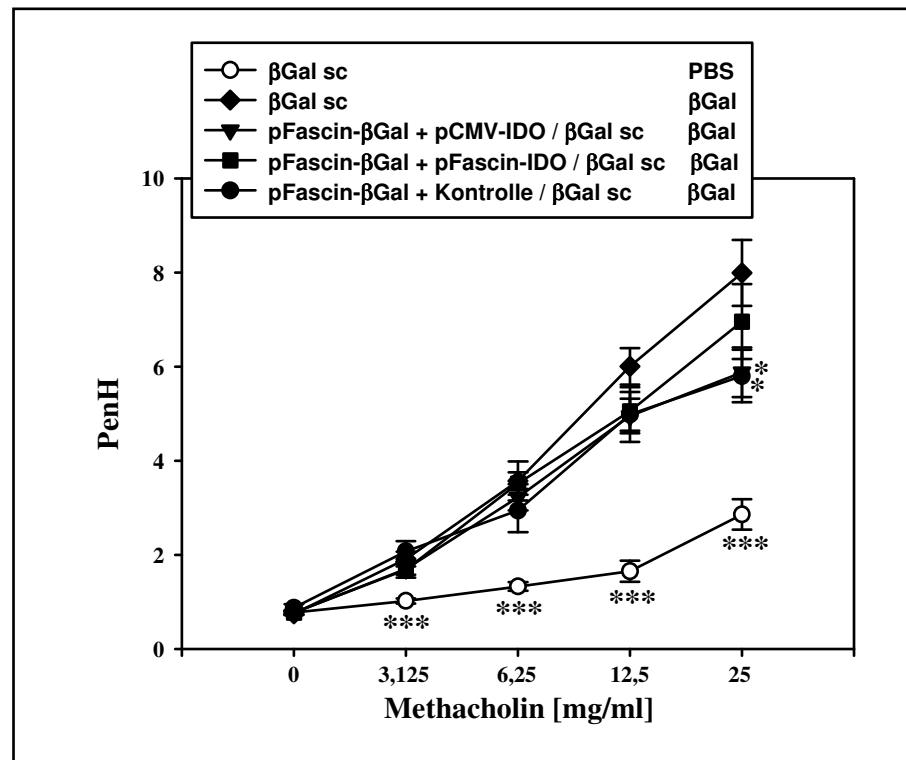
**Abb. 29: Einfluss einer protektiven DNA-Immunisierung mit pFascin-βGal und IDO kodierenden Vektoren auf die IFN-γ- und IL-5-Produktion nach antigenspezifischer Restimulation *in vitro*** BALB/c Mäuse (n=16) wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit pFascin-βGal + Kontroll-Plasmid, pFascin-βGal + pCMV-IDO oder pFascin-IDO immunisiert und im Anschluss daran dreimal im Abstand von einer Woche mit 10 µg βGal-Protein sensibilisiert. Danach wurden die Mäuse durch eine dreimalige Gabe von βGal intranasal provoziert. Als Kontrolle wurden die Mäuse zweier getrennter Gruppen nur mit βGal sensibilisiert und anschließend mit PBS bzw. βGal behandelt. 2 Tage nach der letzten intranasalen Provokation wurden Milz- und Lymphknotenzellen isoliert und in An- (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 25 µg/ml βGal für 72 h Kultiviert. Anschließend wurde das von den Zellen gebildete IFN-γ (**A** Milz, **B** Lymphknoten) und IL-5 (**C** Milz, **D** Lymphknoten) in den Kulturüberständen mittels ELISA nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von vier durchgeführten Experimenten. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu den nur mit dem Protein sensibilisierten und mit βGal provozierten Tiere sind gekennzeichnet (\*p ≤ 0,05, \*\* p ≤ 0,01). Die Unterschiede der mit pCMV-IDO/pFascin-IDO Koimmunisierten Tiere im Vergleich zu den mit βGal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten waren nicht signifikant.

### 3.4.3 Effekt einer prophylaktischen Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal und IDO-kodierenden Vektoren auf die Atemwegsreaktivität

Nach der Vakzinierung und Proteinsensibilisierung wurden BALB/c Mäuse dreimal im Abstand von vierundzwanzig Stunden durch intranasale Gabe von  $\beta$ Gal, zur Provokation einer lokalen Reaktion in der Lunge, behandelt. Positive Kontrolltiere wurden nur mit  $\beta$ Gal sensibilisiert und im Anschluss daran mit  $\beta$ Gal behandelt. Als negative Kontrollgruppe dienten Mäuse die nach subkutaner Proteingabe PBS intranasal verabreicht bekamen. Einen Tag nach der letzten Provokation erfolgte eine nicht-invasive Messung der Atemwegsreaktivität.

In Abbildung 30 sind die Mittelwerte der PenH-Werte von vier durchgeführten Experimenten dargestellt. Bei den proteinsensibilisierten mit PBS behandelten Tieren konnte nur eine geringfügige Steigerung der Atemwegsreaktivität gemessen werden. In den mit  $\beta$ Gal intranasal provozierten Tieren hingegen konnte eine mit steigenden Methacholin-Dosen zunehmende Atemwegshyperreaktivität beobachtet werden. Eine protektive DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und pFascin-EGFP führte unter Verwendung von 12,5 und 25 mg/ml Methacholin zu einer moderaten Reduktion der AHR im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe. Diese Reduktion war signifikant. Die Koimmunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IDO führte ebenfalls zu einer moderaten Reduktion der Atemwegsreaktivität verglichen mit den proteinsensibilisierten Tieren, die vergleichbar war mit den Ergebnissen der mit pFascin-EGFP koimmunisierten Tiere. Auch hier war bei einer Dosis von 25 mg/ml eine signifikante Inhibition zu beobachten. Die prophylaktische Kovakzinierung mit pFascin-IDO führte nicht zu einer solchen Reduktion der Atemwegsreaktivität. Bei einer Methacholin-Dosis von 25 mg/ml lagen die gemessenen PenH-Werte über denen der anderen beiden vakzinierten Gruppen und nur geringfügig unter denen der proteinsensibilisierten Positivkontrolle.

Eine biolistische DNA-Immunisierung mit  $\beta$ Gal unter Kontrolle des Fascin-Promotors führte also nur bei einer Methacholin-Dosis von 25 mg/ml Methacholin zu einer leichten Inhibition der Atemwegsreaktivität, die durch eine zusätzliche Verwendung von IDO nicht weiter gesteigert werden konnte.



**Abb. 30: Einfluss einer protektiven DNA-Immunisierung mit pFascin-βGal und IDO-kodierenden Vektoren auf die Entwicklung einer Atemwegshyperreaktivität nach intranasaler Provokation mit βGal**

BALB/c-Mäuse (n=16) wurden mit pFascin-βGal zusammen mit pFascin-EGFP (schwarze Kreise), pCMV-IDO (schwarze Dreiecke) oder pFascin-IDO (schwarze Vierecke) mit Hilfe der Genpistole immunisiert und im Anschluss daran, dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit βGal Protein subkutan sensibilisiert. Kontrollmäuse wurden nur dreimal mit dem Protein behandelt. Anschließend erfolgte dreimal im Abstand von 24 h eine intranasale Provokation mit βGal bzw. zur Kontrolle bei einem Teil der ausschließlich proteinsensibilisierten Tiere mit PBS (weiße Kreise). Im Anschluss daran wurde eine nicht-invasive Messung der Atemwegshyperreaktivität im Ganzkörper-Plethysmographen durchgeführt. Dabei wurde bei steigenden Methacholin-Dosen (3,125, 6,25, 12,5, 25 mg/ml) die Lungenfunktion gemessen. In der Graphik ist der PenH-Wert als Maß für die Atemwegsreaktivität abgebildet. Als Vergleichswert für die Steigung der Atemwegsreaktivität dient der PenH-Wert, der in Kontrollmäusen ohne Gabe von Methacholin gemessen wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier Experimenten. Signifikante Unterschiede der gemessenen PenH-Werte im Vergleich zur Positivkontrolle, die mit Protein sensibilisiert und mit βGal provoziert wurde (weiße Kreise) sind gekennzeichnet (\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Die Unterschiede innerhalb der biolistisch immunisierten Tiere waren nicht signifikant.



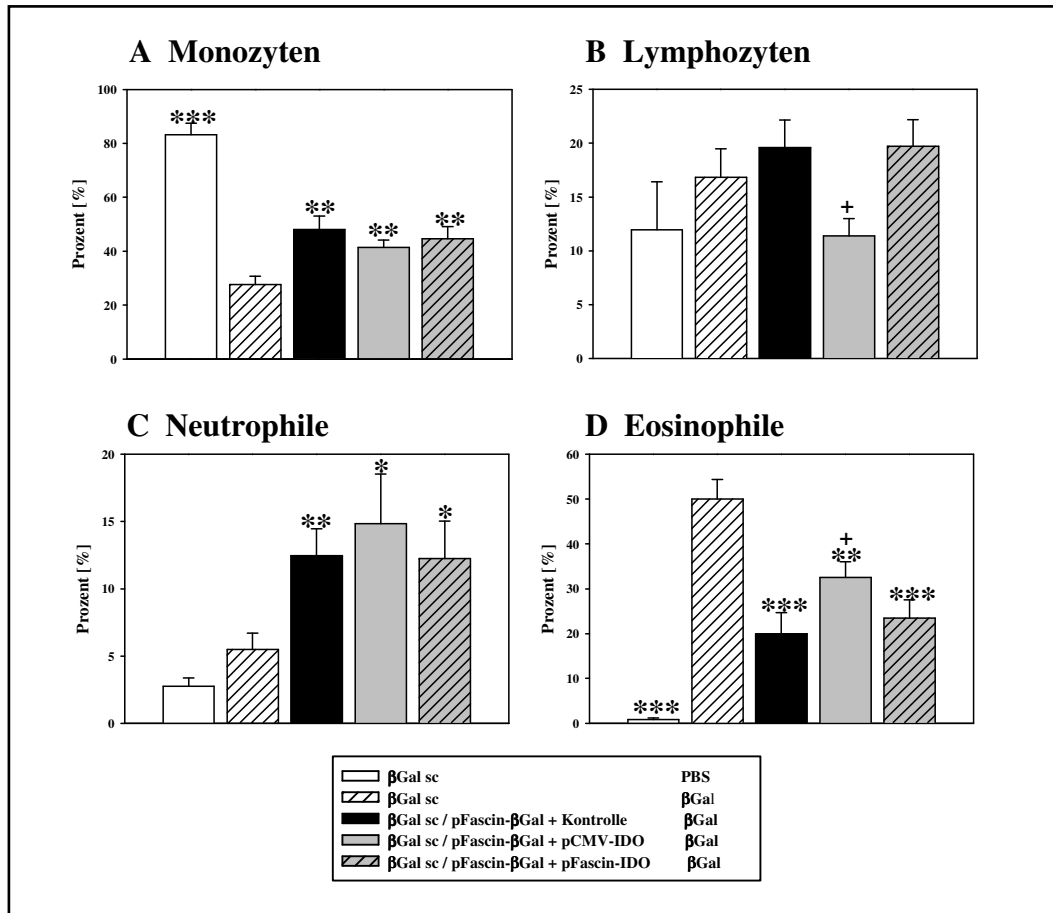
#### **3.4.4 Effekt einer prophylaktischen Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal und IDO-kodierenden Vektoren auf die Zusammensetzung der Zellen in der bronchoalveolären Flüssigkeit**

Einen Tag nach der Messung der Atemwegsreaktivität wurde bei den Mäusen eine Lungenspülung durchgeführt. Von den in der bronchoalveolären Lavage vorhandenen Zellen wurden Zytospin-Präparate angefertigt. Die Zellen wurden nach Anfärben der Zytospins charakterisiert und ausgezählt (Abb. 31). Die Überstände der BAL wurden bis zur weiteren Bestimmung der darin vorhandenen Zytokine IL-5 und IFN- $\gamma$  weggefroren (Abb. 32).

In der mit PBS behandelten Negativkontrolle waren Monozyten die am häufigsten vorkommenden Zellen. Lymphozyten konnten in den Überständen der BAL dieser Tiere ebenfalls nachgewiesen werden. Neutrophile und Eosinophile hingegen waren nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Der Anteil an eosinophilen Granulozyten war signifikant vermindert im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe. In den sensibilisierten mit  $\beta$ Gal behandelten Tieren war ein signifikant geringerer Anteil an Monozyten nachweisbar. Die Zahl der Lymphozyten hingegen war moderat erhöht verglichen mit der Negativkontrolle. Neutrophile waren nur zu einem geringen Anteil in den Lungenspülungen dieser Tiere nachweisbar. Der Anteil an Eosinophilen hingegen war bis auf über 50 Prozent erhöht. Eine prophylaktische DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit dem Kontroll-Plasmid hatte einen steigernden Einfluss auf die Frequenz an Monozyten bezogen auf die Positivkontrolle. Die Anzahl an Lymphozyten war moderat erhöht. Neutrophile konnten signifikant mehr nachgewiesen werden, als bei den Tieren, die nur mit dem Protein sensibilisiert und anschließend mit  $\beta$ Gal behandelt wurden. Der Anteil an Eosinophilen war im Vergleich zu dieser Gruppe signifikant vermindert. Eine Koapplikation mit pCMV-IDO hatte keinen weiteren Effekt auf den prozentualen Anteil an Monozyten. Die Lymphozyten hingegen waren verglichen mit der vakzinierten Kontrollgruppe signifikant vermindert. Der Anteil an Neutrophilen und Eosinophilen hingegen war im Vergleich zu dieser Gruppe moderat erhöht. Eine Koimmunisierung mit pFascin-IDO hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Monozytenzahl. Der Anteil an Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen in der BAL war in etwa vergleichbar mit dem der vakzinierten Kontrolle.

Einhergehend mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen einer moderaten Reduktion der Atemwegshyperreaktivität durch eine protektive biologische DNA-Immunisierung kommt es

auch zur Reduktion des Anteils an eosinophilen Granulozyten, die eine Rolle bei der Auslösung der AHR spielen. Eine Immunisierung in Kombination mit IDO hatte hier keinen weiteren schützenden Einfluss.



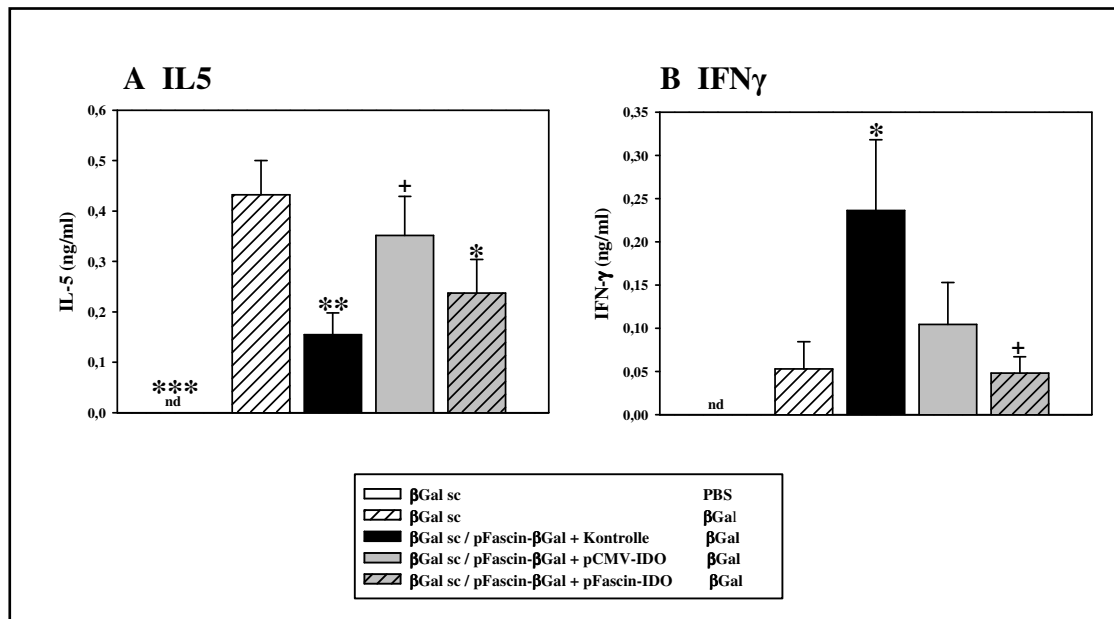
**Abb. 31: Einfluss einer protektiven DNA-Immunisierung mit pFascin-βGal und IDO-kodierenden Vektoren auf die prozentuale Zusammensetzung der Zellen in der BAL nach Provokation mit βGal**

BALB/c-Mäuse (n=16) wurden mit pFascin-βGal + Kontrolle (schwarze Balken), pFascin-βGal + pCMV-IDO (graue Balken), pFascin-βGal + pFascin-IDO (grau schraffierte Balken) immunisiert, mit βGal subkutan sensibilisiert und anschließend durch intranasale Gabe von βGal provoziert. Kontrolltiere wurden mit βGal sensibilisiert und mit βGal (weiß schraffierte Balken) oder PBS (weiße Balken) behandelt. Zwei Tage nach der letzten Provokation wurde eine Spülung der Lungen durchgeführt. Anschließend wurden  $5 \times 10^5$  Zellen mit Hilfe einer Zytospin-Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht, einer Diff-Quick®-Färbung unterzogen und mikroskopisch anhand der Morphologie und des Färbeverhaltens charakterisiert und ausgezählt. Hierbei wurden Monozyten (A), Lymphozyten (B), Neutrophile (C) und Eosinophile (D) unterschieden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier Experimenten. Signifikante Unterschiede der prozentualen Anteile an Zellen nach Immunisierung im Vergleich zu Tieren den mit Protein sensibilisierten Tieren, die mit βGal provoziert wurden, sind gekennzeichnet (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Unterschiede der Tiere, die mit einer Kombination von pFascin-βGal und pCMV-IDO bzw. pFascin-IDO zu denen, die mit dem Kontroll-Plasmid immunisiert wurden sind gekennzeichnet (+  $p \leq 0,05$ ).

In Abbildung 32 sind die in der Lavageflüssigkeit gemessenen Zytokine IL-5 und IFN- $\gamma$  dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte von vier Experimenten. Das mit Th2-Antworten assoziierte Zytokin IL-5 konnte in den Überständen der BAL der nur mit Protein sensibilisierten Negativkontrolle nicht nachgewiesen werden. In der ausschließlich mit dem Protein sensibilisierten Positivkontrolle konnte IL-5 in der höchsten Konzentration nachgewiesen werden. Die Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und pFascin-EGFP führte zu einer signifikanten Inhibition der IL-5 Produktion verglichen mit der Positivkontrolle. Durch die Kovakzinierung mit pCMV-IDO wurde dieser Effekt aufgehoben und die IL-5-Konzentration war signifikant erhöht verglichen mit der biolistisch immunisierten Kontrolle. Die prophylaktische Kovakzinierung mit pFascin-IDO führte wie auch die Behandlung mit pFascin- $\beta$ Gal allein zu einer signifikanten Inhibition im Vergleich zur Positivkontrolle.

Das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  war im Vergleich zu IL-5 in etwas niedrigeren Konzentrationen nachweisbar. Eine Proteinsensibilisierung gefolgt von einer intranasalen Behandlung mit PBS führte nicht zu einer nachweisbaren IFN- $\gamma$ -Produktion. Diese war nach Behandlung mit  $\beta$ Gal moderat gesteigert. Im Gegensatz zu der positiven Kontroll-Gruppe führt die protektive Immunisierung mit der Genpistole mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit dem Kontroll-Plasmid zu einer signifikanten Erhöhung der Konzentration des nachgewiesenen IFN- $\gamma$ . Die IFN- $\gamma$ -Produktion in den mit pCMV-IDO koimmunisierten Tieren lag deutlich unter der der mit dem Kontroll-Plasmid koimmunisierten Tiere. Eine Koapplikation von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pFascin-IDO konnte die IFN- $\gamma$ -Produktion signifikant inhibieren im Vergleich zu der biolistisch vakzinierten Kontrollgruppe.

Eine protektive Behandlung der Tiere mit Hilfe der Genpistole konnte somit eine Induktion der IL-5-Produktion inhibieren, wobei dabei eine Immunisierung in Kombination mit IDO keinen weiteren inhibierenden Effekt hatte. Die Koimmunisierung mit pCMV-IDO hat den durch die biolistische Immunisierung inhibierenden Effekt sogar wieder signifikant aufgehoben. Das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  wurde in der Kontroll-Gruppe nach der DNA-Vakzinierung vermehrt gebildet verglichen mit einer reinen Proteinsensibilisierung. Hier bewirkte die Kovakzinierung mit den beiden IDO-kodierenden Vektoren eine verringerte IFN- $\gamma$  Sekretion.

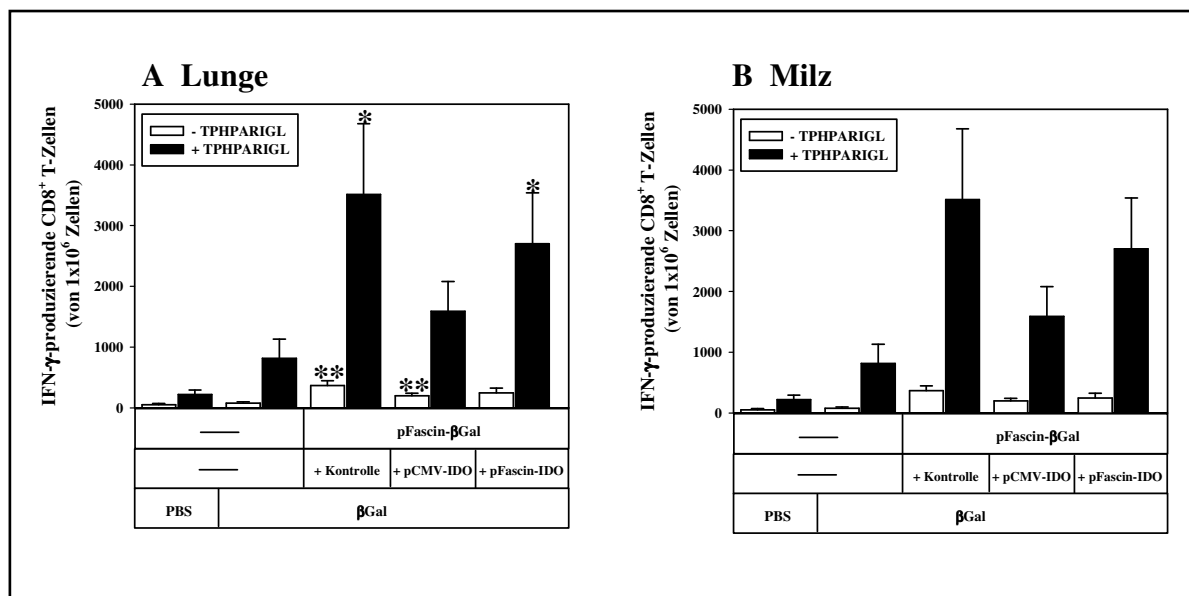


**Abb. 32: Einfluss einer protektiven DNA-Immunisierung mit pFascin-βGal und IDO-kodierenden Vektoren auf die IFN-γ- und IL-5-Produktion in der Lunge BALB/c Mäuse** (n=16) wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit pFascin-βGal + Kontroll-Plasmid (schwarze Balken), pFascin-βGal + pCMV-IDO (graue Balken) oder pFascin-βGal + pFascin-IDO (grau schraffierte Balken) mit der Genpistole immunisiert, anschließend subkutan mit βGal-Protein sensibilisiert und mit βGal intranasal provoziert. Kontrollmäuse wurden mit dem Protein sensibilisiert und mit βGal (weiß schraffierte Balken) bzw. zur Kontrolle mit PBS (weiße Balken) behandelt. An Tag 47 wurde die Lunge der Tiere gespült und anschließend das von den Zellen in der Lunge gebildete IL-5 (A) und IFN-γ (B) in den Überständen der bronchoalveolären Lavage mittels ELISA nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier durchgeführten Experimenten. Signifikante Unterschiede der nachgewiesenen Zytokin-Konzentrationen im Vergleich zu Proteinsensibilisierten Tieren, die mit βGal provoziert wurden sind gekennzeichnet (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Unterschiede der Tiere, die mit einer Kombination von pFascin-βGal und pCMV-IDO bzw. pFascin-IDO zu denen, die mit dem Kontroll-Plasmid immunisiert wurden sind gekennzeichnet (†  $p \leq 0,05$ ).

### 3.4.5 Effekt einer prophylaktischen Vakzinierung mit pFascin-βGal und IDO-kodierenden Vektoren auf die Frequenz IFN-γ-produzierender CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen

Am Tag der Lungenspülung wurde mit den isolierten Milz- und Lungenzellen ein CTL-EliSpot zum Nachweis antigenspezifischer IFN-γ-produzierender CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen durchgeführt (Abb.33). In den Milzen und Lungen der Tiere, die nur mit dem Protein

sensibilisiert wurden, kam es nur zu einer sehr geringen Induktion antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen. Im Vergleich dazu konnte nach einer protektiven Immunisierung mit  $\beta$ Gal-kodierender Plasmid-DNA und einer Koimmunisierung mit dem Kontroll-Plasmid stark erhöhte Zahlen  $\beta$ Gal-spezifischer CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen nachgewiesen werden. Während die Koimmunisierung mit pFascin-IDO nur zu einem geringen inhibitorischen Effekt auf die Induktion der CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen führte, hatte die biolistische Vakzinierung mit einer Kombination von Fascin- $\beta$ Gal und pCMV-IDO eine wesentlich geringere Zahl IFN- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen in Milz und Lunge zur Folge.



**Abb.33: Einfluss einer protektiven DNA-Immunisierung mit IDO-kodierenden Vektoren auf die Induktion CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ -produzierender zytotoxischer T-Zellen in Lunge nach intranasaler Provokation mit  $\beta$ Gal** BALB/c Mäuse (n=16) wurden dreimal im Abstand von einer Woche, mit Hilfe der Genpistole, mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit einem Kontroll-Plasmid, pCMV-IDO oder pFascin-IDO immunisiert, anschließend subkutan mit  $\beta$ Gal sensibilisiert und mit  $\beta$ Gal intranasal provoziert. Kontrollmäuse wurden mit dem Protein sensibilisiert und mit  $\beta$ Gal bzw. zur Kontrolle mit PBS behandelt. An Tag 47 wurden die Lungen der Tiere isoliert und die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde mittels CTL-EliSpot ermittelt. Dazu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in An- (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) des  $\beta$ Gal-Peptides TPHPARIGL kultiviert. Nach 20 Stunden erfolgte die Auswertung des Tests. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier Experimenten. Signifikante Unterschiede der Induktion zytotoxischer T-Zellen im Vergleich zu proteinsensibilisierten mit  $\beta$ Gal behandelten Tieren sind gekennzeichnet, (\*p  $\leq$  0,05, \*\* p  $\leq$  0,01). Die Unterschiede zwischen den DNA immunisierten Tieren waren nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine biolistische DNA-Immunisierung mit allergen- und IDO-kodierender Plasmid DNA nicht zu einer Induktion regulatorischer T-

Zellen führt, die den Effekt einer Proteinsensibilisierung inhibieren können. Die Effekte, die bei einer biologischen Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IDO beobachtet werden konnten, sind also möglicherweise nicht durch Tregs vermittelt, sondern eventuell direkt zellvermittelt. Eine Rolle könnte hierbei die durch IDO induzierte T-Zell-Apoptose spielen. Es könnte allerdings auch sein, dass Tregs entstehen, diese aber zu einem späteren Zeitpunkt, während und nach der Proteinsensibilisierung bereits nicht mehr vorhanden sind. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass mittels Durchflusszytometrie und Realtime-PCR ebenfalls keine regulatorischen T-Zellen nach Koimmunisierung mit IDO nachgewiesen werden konnten.

### **3.5 Therapeutische Kovakzinierung mit IDO kodierender Plasmid-DNA im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung**

Die in den bisherigen Versuchen in Folge der Koimmunisierung mit IDO-kodierenden Vektoren beobachteten inhibitorischen Effekte auf die antigenspezifische Immunantwort waren bei Verwendung von pCMV-IDO sehr viel deutlicher ausgeprägt als bei Verwendung von pFascin-IDO. In den im Folgenden dargestellten Versuchen zur therapeutischen Vakzinierung wurde daher unter Berücksichtigung der großen Gruppen- und Tierzahlen nur noch pCMV-IDO verwendet.

Zunächst wurde untersucht, ob eine therapeutische DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal bzw. pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO einen Effekt auf die durch eine zuvor durchgeführte Proteinsensibilisierung induzierte Th2-Immunantwort hat. Dazu wurden BALB/c Mäuse zunächst dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit  $\beta$ Gal-Protein subkutan sensibilisiert und anschließend mit Hilfe der Genpistole vakziniert. Nach der Proteinsensibilisierung wurden die antigenspezifischen IgG-Titer in den Seren der Mäuse bestimmt, damit die Mäuse in Gruppen mit vergleichbaren mittleren Serumtitern eingeteilt werden konnten. Nach der DNA-Immunisierung wurden erneut die IgG-Titer ermittelt. Des Weiteren wurden die Zytokin-Produktion von Milz- und Lymphknotenzellen nach antigenspezifischer Stimulation, die Atemwegsreaktivität der Tiere und die Zusammensetzung der Zellen in der Bronchoalveolären Lavage sowie die darin vorhandenen Zytokine bestimmt.

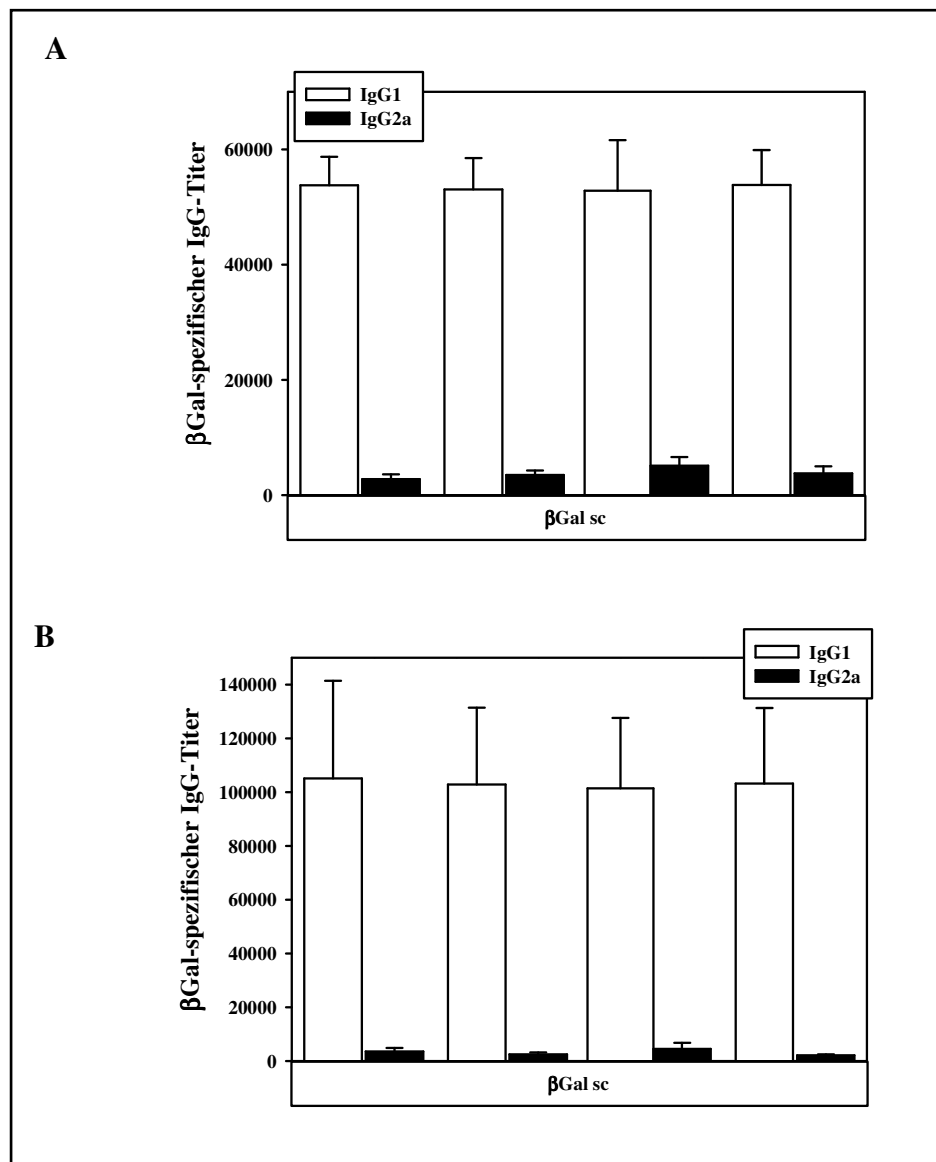
### **3.5.1 Einfluss einer therapeutischen Vakzinierung mit $\beta$ Gal-kodierenden Vektoren zusammen mit pCMV-IDO auf die IgG-Produktion**

Nach der subkutanen Immunisierung wurden die antigenspezifischen IgG-Titer im Serum der Mäuse bestimmt, um diese daraufhin in Gruppen mit einem vergleichbaren mittleren Titer einzuteilen.

Wie in Abbildung 34 gezeigt wird durch die Proteinsensibilisierung eine Th2-vermittelte Immunantwort induziert, einhergehend mit der Produktion von überwiegend IgG1-Antikörpern. Anhand der IgG1-Titer wurden die Mäuse in vier Gruppen mit jeweils vier Mäusen je Gruppe eingeteilt. Bei zwei der Gruppen wurde in den folgenden drei Wochen eine biolistische DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal bzw. pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit und pCMV-IDO bzw. pFascin-EGFP als Kontroll-Vektor durchgeführt.

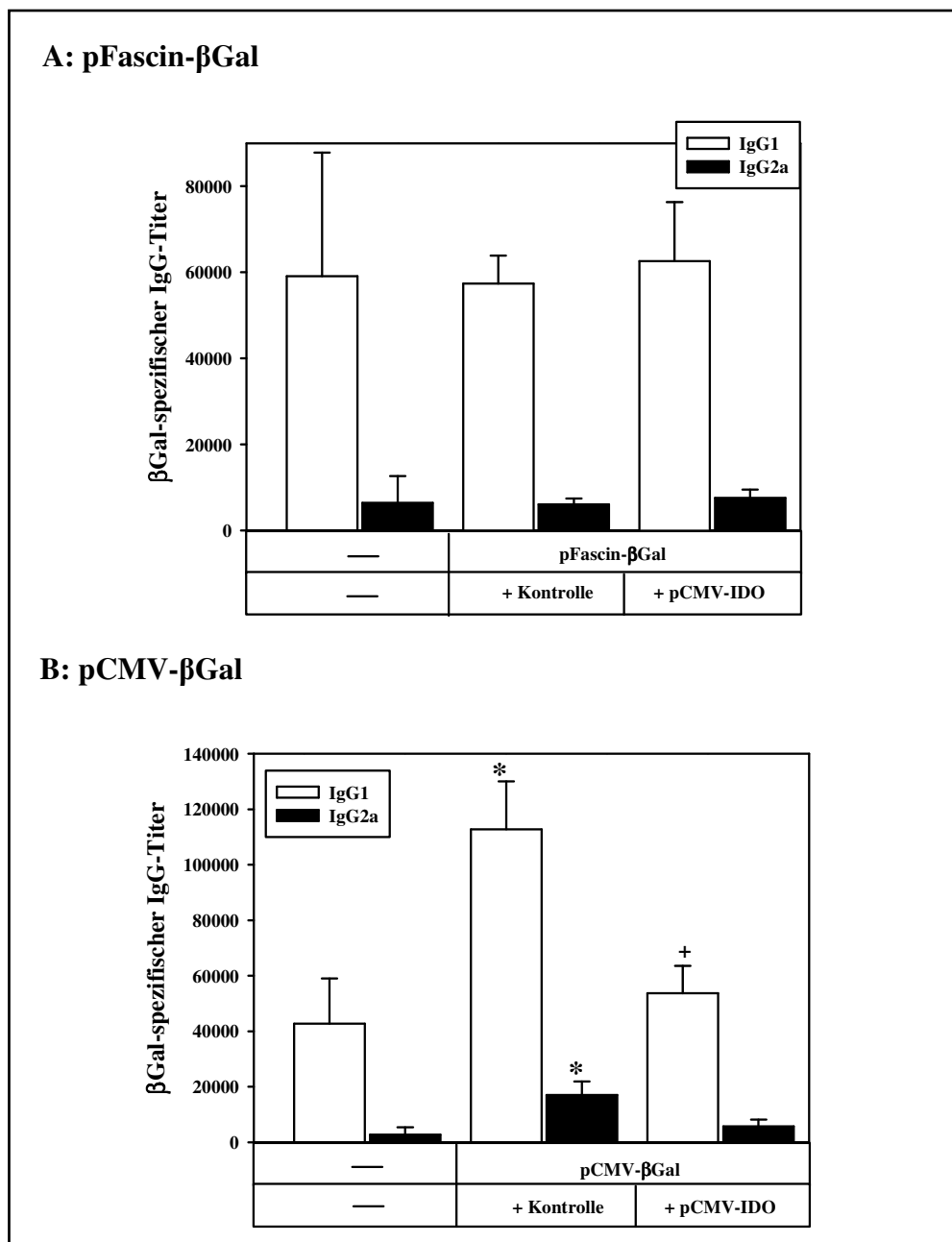
Anschließend erfolgte eine erneute Serumnahme, um den Verlauf der Produktion des  $\beta$ Gal-spezifischen IgG zu bestimmen. Das Verhältnis der Subklassen IgG1 und IgG2a wurde weder durch die DNA-Vakzinierung mit Fascin- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid noch durch die biolistische Vakzinierung mit Fascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO beeinflusst, in beiden Gruppen wurde weiterhin vor allem IgG1 gemessen, das für eine Th2-Antwort typisch ist (Abb. 35). In den vakzinierten Mäusen wurden wie im Serum der Mäuse, die nur mit dem Protein sensibilisiert wurden, vergleichbare Mengen an IgG1 und IgG2a nachgewiesen.

Im Gegensatz dazu führte die DNA-Vakzinierung mit pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid im Vergleich zu den Werten der Tiere, die nur mit dem Protein sensibilisiert wurden, zu einer signifikant höheren Bestimmung von sowohl IgG1- als auch IgG2a-Antikörpern. Der vorherrschend produzierte IgG-Isotyp war jedoch auch hier IgG1. Die infolge der Vakzinierung mit pCMV- $\beta$ Gal induzierte Zunahme der IgG-Produktion wurde durch die Kovakzinierung mit pCMV-IDO verhindert, die IgG1- und IgG2a-Titer lagen in dem Bereich der nicht vakzinierten Kontrollgruppen.



**Abb. 34: Gruppeneinteilung anhand der IgG-Produktion im Serum nach Proteinsensibilisierung BALB/c Mäuse (A: n=16, B: n=8)** wurden dreimal im Abstand von einer Woche mit 10 µg βGal subkutan immunisiert. Vier bis fünf Tage nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und der Gehalt an βGal spezifischem IgG1 und IgG2a im Serum wurde mittels ELISA bestimmt. Die Mäuse wurden daraufhin in Gruppen mit vergleichbaren IgG-Titern eingeteilt. Die in **A** dargestellten Tiere wurden für eine Vakzinierung mit pFascin-βGal verwendet, die in **B** dargestellten Tiere wurden für eine Vakzinierung mit pCMV-βGal genutzt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM der Titer individueller Seren.





**Abb. 35: Einfluss einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit pFascin-βGal bzw. pCMV-βGal zusammen mit pCMV-IDO auf die IgG-Produktion im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung** BALB/c Mäuse (**A**: n=16-32, **B**: n=8-16) wurden dreimal im Abstand von einer Woche mit 10 µg βGal subkutan immunisiert. Anschließend wurden sie dreimal mit pFascin-βGal (**A**) oder pCMV-βGal (**B**) zusammen mit einem Kontroll-Plasmid oder pCMV-IDO mit der Genpistole immunisiert. Als Kontrolle dienten Tiere, die nur mit dem Protein sensibilisiert wurden. Vier bis fünf Tage nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und der Gehalt an βGal spezifischem IgG1 und IgG2a im Serum wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Titer individueller Seren. Signifikante Unterschiede der Serum-Titer vakzinierter Tiere im Vergleich zu Tieren, die ausschließlich mit dem Protein sensibilisiert wurden, sind gekennzeichnet (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ). Signifikante Unterschiede zwischen den Tieren, die mit dem Kontroll-Plasmid oder pCMV-IDO kovakzinieren wurden, sind gekennzeichnet (\* $p \leq 0,05$ ).

### 3.5.2 Einfluss einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit $\beta$ Gal-kodierenden Vektoren zusammen mit pCMV-IDO auf die Atemwegsreaktivität

Um den Effekt einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit  $\beta$ Gal-kodierenden Plasmiden zusammen mit pCMV-IDO auf die Atemwegsreaktivität zu testen, wurden BALB/c Mäuse dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit  $\beta$ Gal-Protein sensibilisiert. Im Anschluss daran erfolgte eine therapeutische Immunisierung mit Hilfe der Genpistole mit pFascin- $\beta$ Gal bzw. pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit pFascin-EGFP oder pCMV-IDO. Kontrollmäusen wurde nur das Protein appliziert. Im Anschluss daran erfolgte eine intranasale Provokation mit  $\beta$ Gal zur Auslösung einer lokalen Reaktion in der Lunge. Als negative Kontrollgruppe dienten Mäuse, denen nach subkutaner Proteingabe PBS intranasal verabreicht wurde. Einen Tag nach der letzten Provokation erfolgte bei allen Mäusen eine nicht-invasive Messung der Atemwegsreaktivität in einem Ganzkörper-Plethysmographen.

In Abbildung 36 sind die Mittelwerte der gemessenen PenH-Werte von jeweils zwei durchgeführten Experimenten dargestellt.

Bei den proteinsensibilisierten Tieren, die lokal mit PBS behandelt wurden, wurde nur eine geringfügige Erhöhung der PenH-Werte gemessen. Im Gegensatz dazu war in den Tieren, die  $\beta$ Gal intranasal verabreicht bekamen, eine mit steigenden Methacholin-Dosen zunehmende Atemwegsreaktivität zu beobachten. Eine therapeutische DNA- Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid führte zu einer moderaten Reduktion der Atemwegshyperreaktivität im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe. Eine biolistische Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IDO führte bei höheren Methacholin-Dosen (ab einer Dosis von 6,25 mg/ml) zu einer im Vergleich zu der Positivkontrolle und zu den mit dem Kontroll-Plasmid immunisierten Tieren verminderten AHR. Diese Verringerung der Atemwegsreaktivität war nicht signifikant.

Durch eine therapeutische Vakzinierung mit pCMV- $\beta$ Gal in Kombination mit dem Kontroll-Plasmid kam es ab einer Methacholin-Dosis von 12,5 mg/ml zu einer Reduktion der Atemwegshyperreaktivität im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe. Diese lag bei den letzten beiden verwendeten Methacholin-Dosen bei etwa 50-55 Prozent unter den gemessenen Werten der positiven Kontrollgruppe. Die Reduktion der Atemwegsreaktivität war allerdings bei allen Methacholin-Dosen nicht signifikant. Eine biolistische Immunisierung in Kombination mit pCMV-IDO führte zu einem Anstieg der Atemwegsreaktivität, die in den

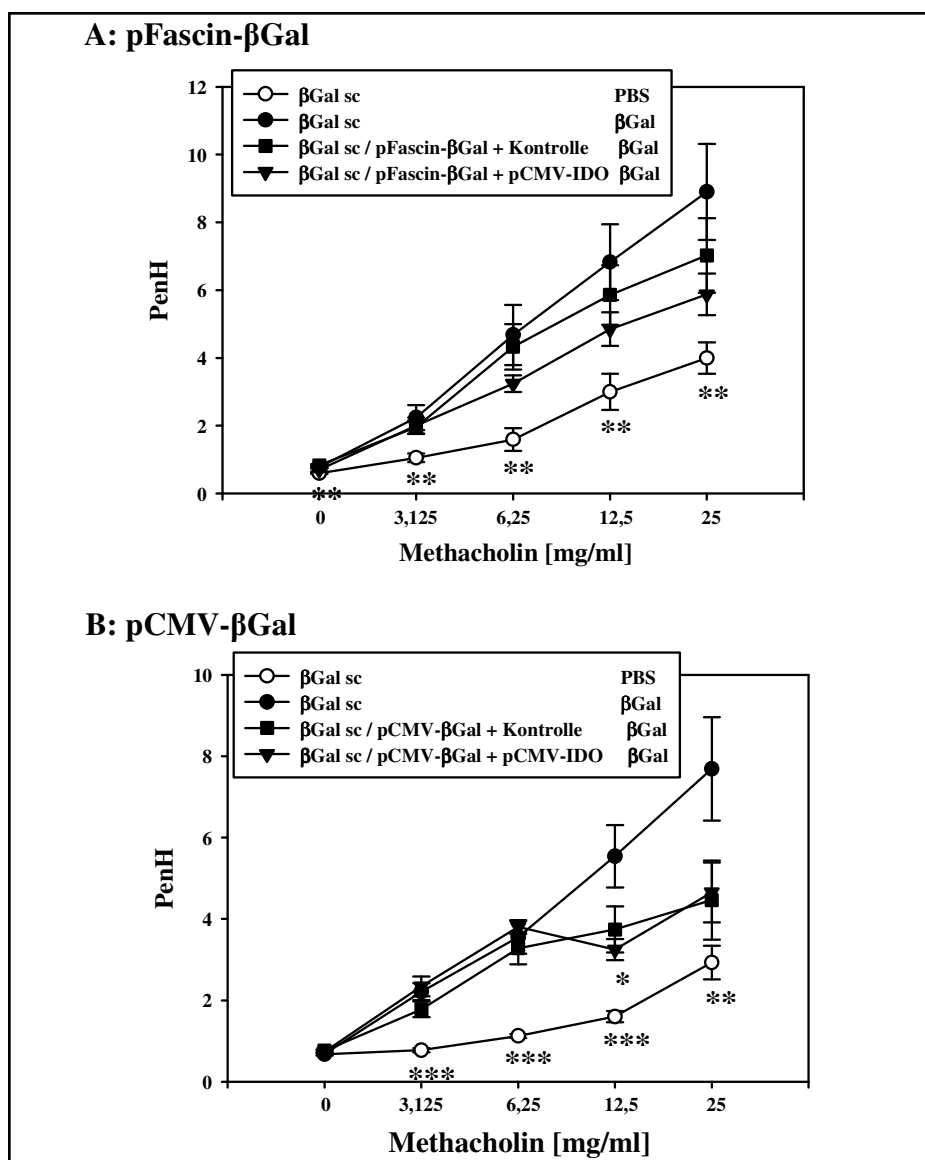
ersten beiden Dosen vergleichbar mit der der proteinsensibilisierten positiven Kontrollmäuse war. Bei einer Methacholin-Dosis von 12,5 mg/ml war der gemessene PenH-Wert signifikant reduziert verglichen mit der Tieren, die mit Protein sensibilisiert und mit  $\beta$ Gal intranasal behandelt wurden.

Eine therapeutische biolistische DNA-Immunisierung mit  $\beta$ Gal unter Kontrolle des Fascin-Promotors führte demnach zu einer leichten Inhibition der Atemwegsreaktivität, die durch eine Koapplikation von pCMV- IDO noch gesteigert werden konnte.

Entgegen der Erwartungen, dass eine DNA-Vakzinierung mit pCMV- $\beta$ Gal zu einer erhöhten Atemwegsreaktivität führt, kam es durch eine therapeutische biolistische DNA-Immunisierung mit  $\beta$ Gal unter Kontrolle des CMV-Promotors zu einer Inhibition der Atemwegsreaktivität, die durch eine Koapplikation von pCMV-IDO nicht weiter verstärkt werden konnte.

### **3.5.3 Einfluss einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit $\beta$ Gal-kodierenden Vektoren zusammen mit pCMV-IDO auf die zelluläre Zusammensetzung der bronchoalveolären Flüssigkeit**

Am Tag nach der Bestimmung der Atemwegsreaktivität wurde eine bronchoalveoläre Lavage bei den Mäusen durchgeführt. Von der zellulären Fraktion wurden Zytospin-Präparate angefertigt, die Zellen darauf angefärbt und anschließend anhand ihres charakteristischen Färbeverhaltens identifiziert und ausgezählt (Abb. 37, 38). In den so gewonnenen Überständen der Lungenspülung wurden die Zytokine IL-5 und IFN- $\gamma$  mittels ELISA bestimmt (Abb. 39).



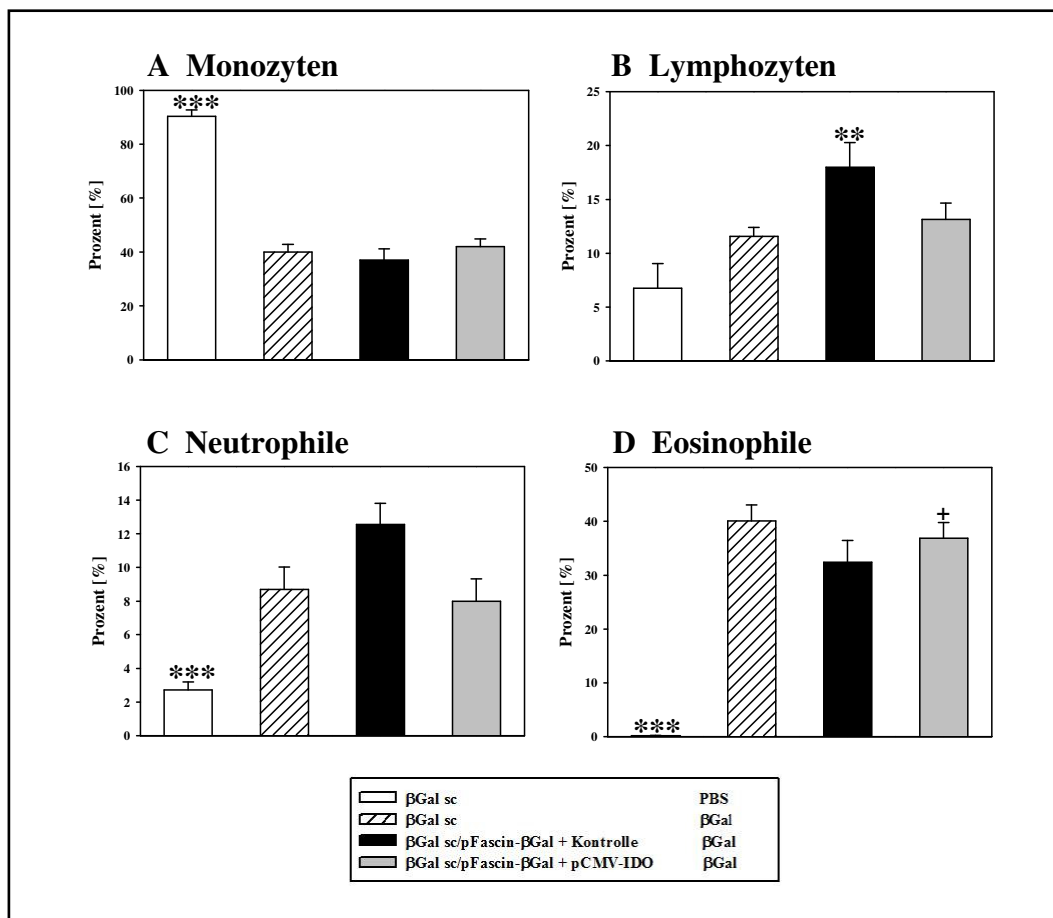
**Abb. 36:** Einfluss einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit Fascin-βGal bzw. pCMV-βGal zusammen mit pCMV-IDO auf die Entwicklung einer Atemwegshyperreaktivität im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung BALB/c-Mäuse (n=8) wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche mit 10 µg βGal-Protein subkutan sensibilisiert und anschließend mit pFascin-βGal (A) bzw. pCMV-βGal (B) zusammen mit pFascin-EGFP (schwarze Vierecke) oder pCMV-IDO (schwarze Dreiecke) mit Hilfe der Genpistole vakziniert. Als Kontrolle dienten Mäuse, die nur dreimal mit dem Protein immunisiert wurden. Anschließend erfolgte dreimal im Abstand von 24 Stunden eine intranasale Provokation mit βGal. Als Kontrolle wurde einem Teil der ausschließlich proteinsensibilisierten Tiere PBS appliziert (weiße Kreise). Im Anschluss daran wurde eine nicht-invasive Messung der Atemwegsreaktivität im Ganzkörper-Plethysmographen durchgeführt. Dazu wurde bei steigenden Methacholin-Dosen (3,125; 6,25; 12,5; 25 mg/ml) die Lungenfunktion gemessen. In der Graphik ist der gemessene PenH-Wert als Maß für die Atemwegsreaktivität abgebildet. Als Vergleichswert für die Steigung der Atemwegsreaktivität dient der PenH-Wert ohne Gabe von Methacholin. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von individuellen Tieren, die in zwei Experimenten bestimmt wurden. Signifikante Unterschiede der gemessenen PenH-Werte im Vergleich zur Positivkontrolle, die mit Protein sensibilisiert und mit βGal provoziert wurde (schwarze Kreise) sind gekennzeichnet (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Die Unterschiede innerhalb der biolistisch immunisierten Tiere waren nicht signifikant.

In Abbildung 37 sind die Ergebnisse für eine therapeutische DNA-Immunisierung mit pFascin-βGal dargestellt. In der negativen Kontrollgruppe wurden Monozyten mit dem höchsten prozentualen Anteil nachgewiesen, Lymphozyten und Neutrophile waren hingegen in deutlich geringerer Frequenz vertreten, Eosinophile waren in der Lungenspülung kaum vorhanden. Nach intranasaler Provokation mit dem Antigen war der Anteil an Lymphozyten und Neutrophilen nur moderat erhöht, die Anzahl an Eosinophilen hingegen stieg auf etwa 40 Prozent, der prozentuale Anteil an Monozyten nahm dementsprechend ab. Eine DNA-Immunisierung mit pFascin-βGal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid führte zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils der Lymphozyten. Der Anteil an Neutrophilen war ebenfalls erhöht, während die Anzahl an Eosinophilen hingegen reduziert war. Die therapeutische Koimmunisierung mit pCMV-IDO führte ebenso zu einer verringerten Anzahl an Monozyten verglichen mit der Negativkontrolle. Die Lymphozyten waren reduziert im Vergleich zu den Tieren, die mit pFascin-βGal und dem Kontroll-Plasmid immunisiert wurden. Das gleiche konnte für die Neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Die Eosinophilen Granulozyten waren leicht aber signifikant erhöht verglichen mit der vakzinierten Kontrolle.

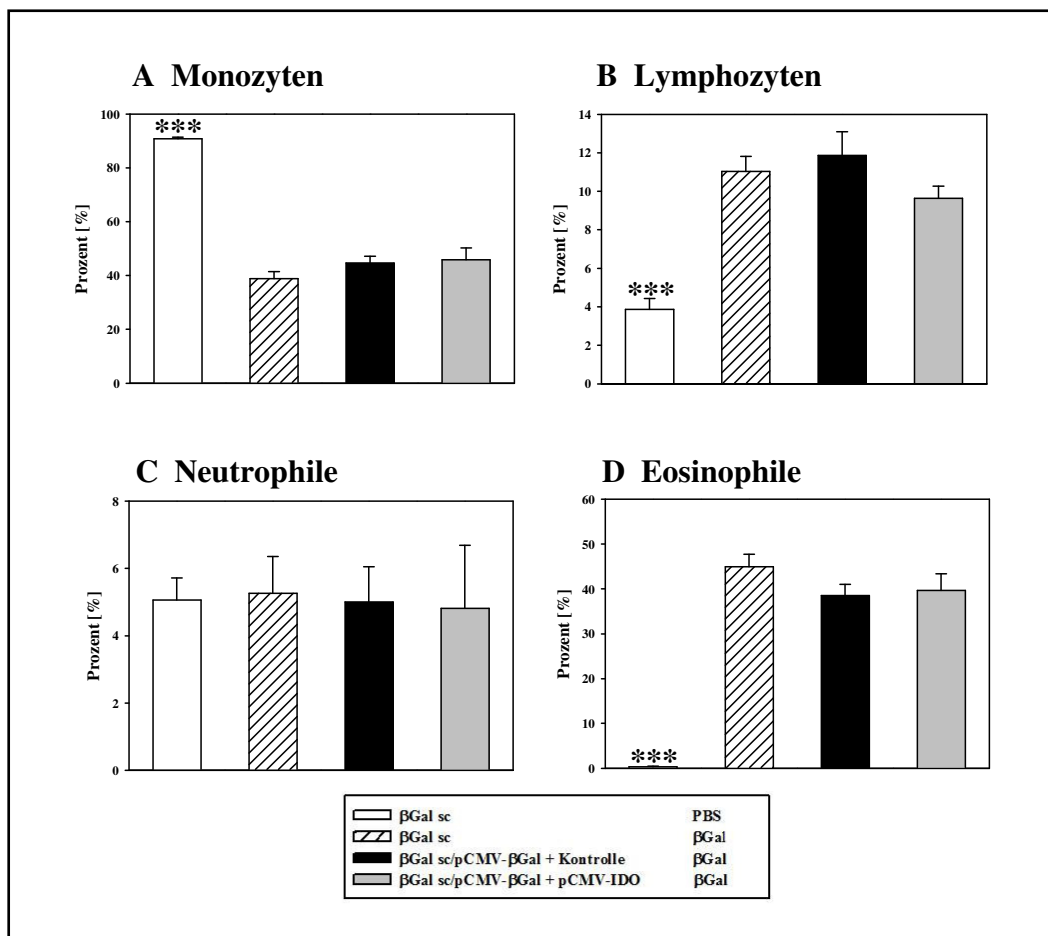
In Abbildung 38 sind die Ergebnisse der Vakzinerung mit pCMV-βGal dargestellt. Die proteinsensibilisierten Gruppen waren größtenteils vergleichbar mit den zuvor beschriebenen. Bei einer therapeutischen Vakzinierung mit pCMV-βGal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid war der Anteil an Monozyten, Lymphozyten und Neutrophilen in etwa gleich hoch wie der der Positivkontrolle. Lediglich der Anteil an Eosinophilen war leicht vermindert verglichen mit der proteinsensibilisierten Positivkontrolle. Die Kovakzinierung mit pCMV-IDO führte verglichen mit den vakzinierten Kontrolltieren zu einer reduzierten Lymphozytenzahl. Die Anteile an Monozyten, Neutrophilen und Eosinophilen waren vergleichbar mit denen der mit pCMV-βGal und dem Kontroll-Plasmid vakzinierten Tiere.

Bei einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit pFascin-βGal kommt es also zu einem moderaten Anstieg des Anteils an eosinophilen Granulozyten sowie zu einer Reduktion der Neutrophilen und Lymphozyten durch die Koimmunisierung mit pCMV-IDO.

Bei einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit pCMV-βGal und in Kombination mit pCMV-IDO anstelle des Kontroll-Vektors kommt es nur zu einer Abnahme der Lymphozyten.



**Abb. 37: Einfluss einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit Fascin-βGal zusammen mit pCMV-IDO auf die zelluläre Zusammensetzung der BAL im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung** BALB/c-Mäuse (n=16-24 (pFascin-βGal + Kontrolle: n=16)) wurden dreimal im Abstand Woche mit 10 µg βGal subkutan sensibilisiert und anschließend dreimal mit pFascin-βGal + Kontrolle (schwarze Balken) oder pFascin-βGal + pCMV-IDO (graue Balken) immunisiert. Anschließend wurde durch die intranasale Gabe von βGal eine lokale Reaktion in der Lunge provoziert. Kontrolltiere wurden nur mit βGal sensibilisiert und mit βGal (schraffierte Balken) oder PBS (weiße Balken) behandelt. Zwei Tage nach der letzten Provokation wurde eine Spülung der Lungen durchgeführt. Anschließend wurden  $5 \times 10^5$  Zellen mit Hilfe einer Zytospin-Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht, einer Diff-Quick®-Färbung unterzogen und mikroskopisch anhand der Morphologie und des Färbeverhaltens charakterisiert und ausgezählt. Hierbei wurden Monozyten (A), Lymphozyten (B), Neutrophile (C) und Eosinophile (D) unterschieden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier (pFascin-βGal + Kontrolle) bis sechs Experimenten. Signifikante Unterschiede der prozentualen Anteile an Zellen im Vergleich zu Tieren, die mit dem Protein sensibilisiert und mit βGal provoziert wurden, sind gekennzeichnet (\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Unterschiede der Tiere, die mit einer Kombination von pFascin-βGal und pCMV-IDO immunisiert wurden im Vergleich zu denen, die mit dem Kontroll-Plasmid koimmunisiert wurden sind gekennzeichnet (†  $p \leq 0,05$ ).



**Abb. 38: Einfluss einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit pCMV-βGal zusammen mit pCMV-IDO auf die zelluläre Zusammensetzung der BAL im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsentzündung** BALB/c-Mäuse (n=8) wurden dreimal im Abstand Woche mit 10 µg βGal subkutan sensibilisiert und anschließend dreimal mit pCMV-βGal + Kontrolle (schwarze Balken) oder pCMV-βGal + pCMV-IDO (graue Balken) immunisiert. Anschließend wurde durch die intranasale Gabe von βGal eine lokale Reaktion in der Lunge provoziert. Kontrolltiere wurden nur mit βGal sensibilisiert und mit βGal (schraffierte Balken) oder PBS (weiße Balken) behandelt. 2 Tage nach der letzten Provokation wurde eine Spülung der Lungen durchgeführt und anschließend  $5 \times 10^5$  Zellen mit Hilfe einer Zytospin-Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht, einer Diff-Quick®-Färbung unterzogen und mikroskopisch anhand der Morphologie und des Färbeverhaltens charakterisiert und ausgezählt. Hierbei wurden Monozyten (A), Lymphozyten (B), Neutrophile (C) und Eosinophile (D) unterschieden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei Experimenten. Signifikante Unterschiede der prozentualen Anteile an Zellen im Vergleich zu Tieren, die mit dem Protein sensibilisiert und mit βGal provoziert wurden, sind gekennzeichnet (\*\*\*) ( $p \leq 0,001$ ). Unterschiede der biolistisch koimmunisierten Tiere untereinander waren nicht signifikant.

In Abbildung 39 sind die in den Überständen der bronchoalveolären Lavage gemessenen Konzentrationen der Zytokine IL-5 und IFN- $\gamma$  dargestellt.

Durch die lokale Provokation mit  $\beta$ Gal kam es in den positiven Kontrolltieren zu einem deutlichen Anstieg an IL-5. IFN- $\gamma$  hingegen konnte nur in geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden.

Eine therapeutische Immunisierung mit der Genpistole mit einer Plasmid-Kombination von pFascin- $\beta$ Gal und der Kontrolle führte zu einer Erhöhung der IL-5 Konzentration nach verglichen mit den mit  $\beta$ Gal sensibilisierten Kontrolltieren. Im Vergleich dazu kam es durch eine therapeutische Applikation von Fascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO zu einer verminderten IL-5-Produktion.

Die höchste IFN- $\gamma$ -Produktion war nach einer therapeutischen Behandlung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid nachweisbar. Die geringste Konzentration an IFN- $\gamma$  konnte in den Lungenspülungen der Tiere nachgewiesen werden, die mit Fascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IDO behandelt wurden. Die Reduktion IFN- $\gamma$ -Produktion war signifikant verglichen mit der proteinsensibilisierten Positivkontrolle und den mit Fascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten Tieren.

In C und D sind die Ergebnisse der mit pCMV- $\beta$ Gal vakzinieren Tiere dargestellt. Eine therapeutische DNA-Immunisierung mit der Genpistole mit pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid oder mit pCMV-IDO führte, im Gegensatz zu einer Kovakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO, zu einer signifikant verminderten IL-5-Produktion verglichen mit der Positivkontrolle. Hierbei lag die gemessene IL5-Konzentration nach Koimmunisierung mit pCMV-IDO unter der nach Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal in Kombination mit dem Kontroll-Plasmid.

Bei einer therapeutischen Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid konnten vergleichbare Konzentrationen wie bei den proteinsensibilisierten positiven Kontrolltieren nachgewiesen werden. In den Lungenspülungen der mit pCMV- $\beta$ Gal und pCMV-IDO koimmunisierten Tiere war kein IFN- $\gamma$  nachweisbar.

Eine therapeutische Behandlung der Tiere mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO mit Hilfe der Genpistole konnte also die IFN- $\gamma$ -Produktion signifikant inhibieren, verglichen mit den positiven Kontrolltieren und auch im Vergleich zu den mit CMV- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid kovakzinieren Tieren. Die IL-5-Konzentration war moderat vermindert.

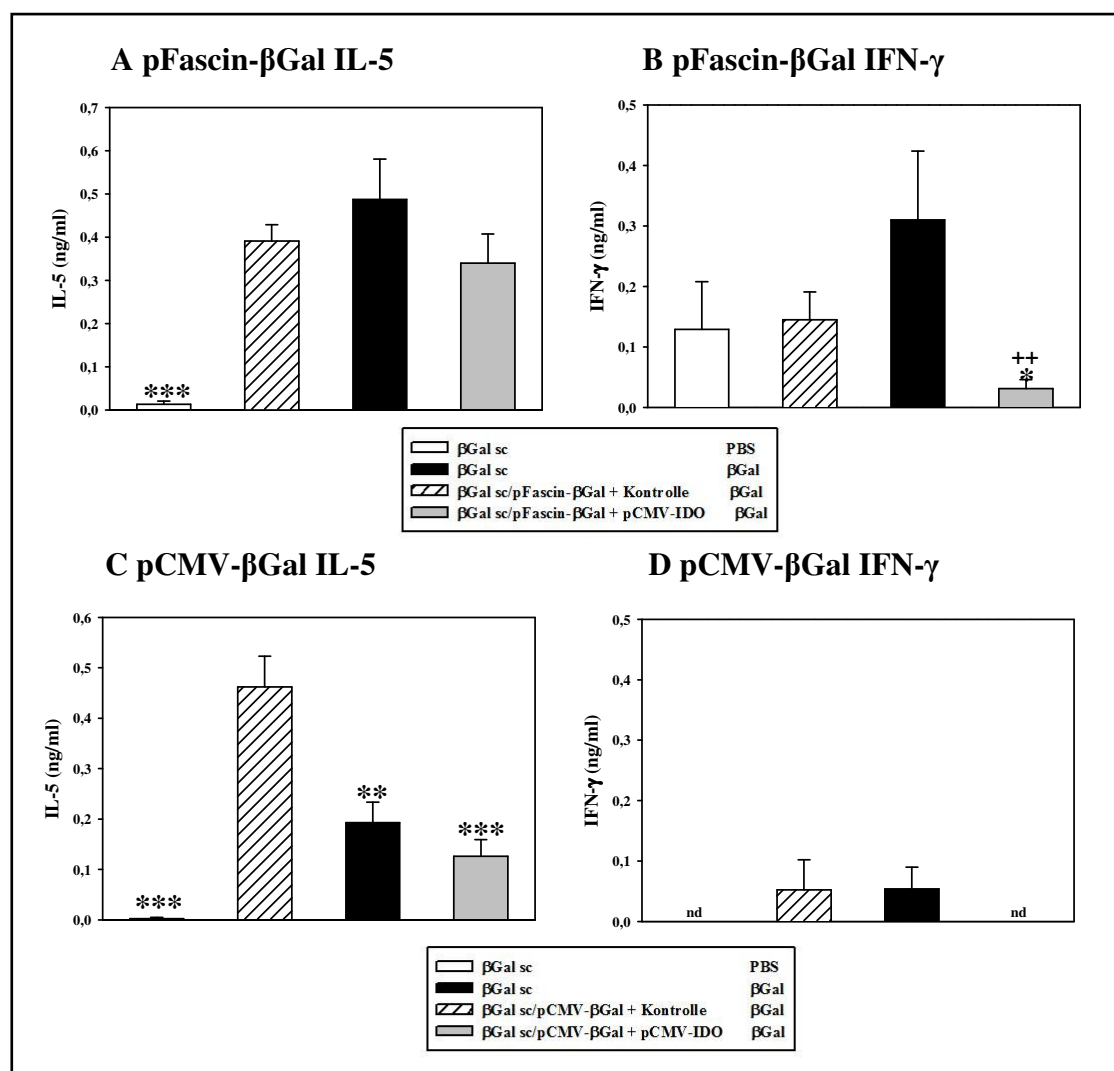


Eine therapeutische Behandlung der Tiere mit pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO mit Hilfe der Genpistole konnte die IL-5- und IFN- $\gamma$ -Produktion, verglichen mit den mit pCMV- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Pasmid behandelten Tieren, geringfügig inhibieren. Die gemessenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen waren in den durchgeführten Experimenten allerdings niedrig.

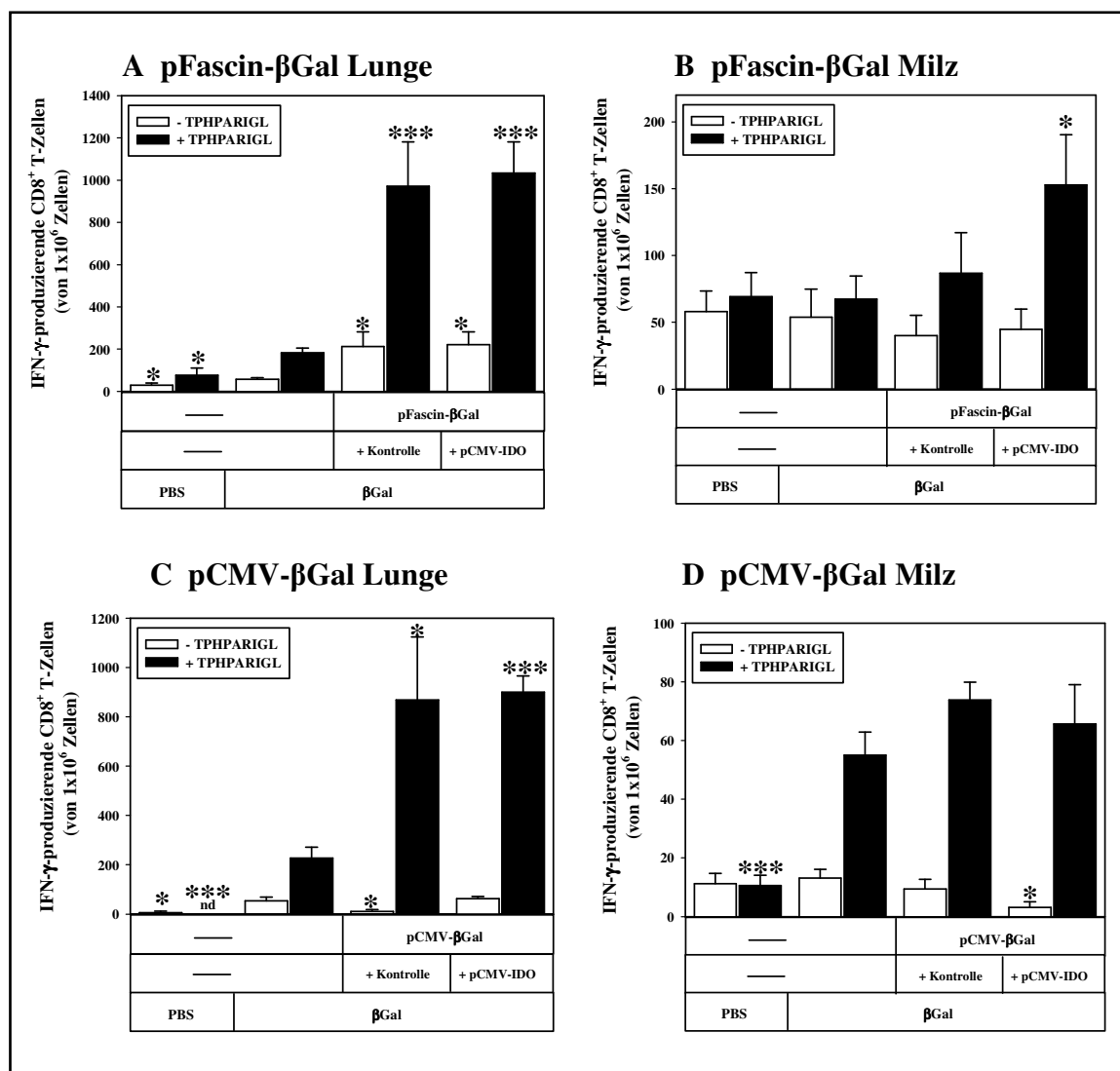
### **3.5.5 Einfluss einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit $\beta$ Gal-kodierenden Vektoren zusammen mit pCMV-IDO auf die Frequenz IFN- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen**

Am Tag der bronchoalveolären Lavage wurden Milz und Lungen entnommen und mit den daraus isolierten Zellen ein CTL-EliSpot zum Nachweis antigenspezifischer IFN- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen durchgeführt (Abb.40). In den Milzen und Lungen der Tiere, die nur mit dem Protein sensibilisiert wurden konnte nur eine geringe Anzahl antigenspezifischer IFN- $\gamma$ -produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wurde nach einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal eine stark erhöhte Anzahl zytotoxischer T-Zellen in der Lunge nachgewiesen. Diese war vergleichbar, wenn mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IDO immunisiert wurde. In der Milz war die Anzahl antigenspezifischer IFN- $\gamma$ -produzierender zytotoxischer T-Zellen nach Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid leicht erhöht und nach Koimmunisierung mit pCMV-IDO stärker erhöht. Nach einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit dem Kontroll-Plasmid oder mit pCMV-IDO konnte im Vergleich zur Positivkontrolle eine stark erhöhte Anzahl antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen in der Lunge nachgewiesen werden. Diese war in den mit pCMV-IDO koimmunisierten Tieren vergleichbar. Eine tendenziell geringfügige Erhöhung der zytotoxischen T-Zellen wurde nach Koimmunisierung mit pCMV-IDO in der Milz gefunden.

Die Koimmunisierung mit pCMV-IDO hat keinen inhibierenden Effekt auf die Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender zytotoxischer T-Zellen in Lunge und Milz.



**Abb. 39 Einfluss einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit Fascin-βGal bzw. pCMV-βGal zusammen mit pCMV-IDO auf die IFN-γ- und IL-5-Produktion in der Lunge BALB/c Mäuse (n=16-24)** wurden dreimal im Abstand Woche mit 10 μg βGal subkutan sensibilisiert und anschließend dreimal mit pFascin-βGal/pCMV-βGal + Kontrolle (schwarze Balken) oder pFascin-βGal/pCMV-βGal + pCMV-IDO (graue Balken) immunisiert und mit βGal intranasal provoziert. Kontrollmäuse wurden mit dem Protein sensibilisiert und mit βGal (weiß schraffierte Balken) bzw. zur Kontrolle mit PBS (weiße Balken) behandelt. An Tag 47 wurde die Lunge der Tiere gespült und anschließend das von den Zellen in der Lunge gebildete IL-5 (**A:** pFascin-βGal, **C:** pCMV-βGal) und IFN-γ (**B:** pFascin-βGal, **D:** pCMV-βGal) in den Überständen der bronchoalveolären Lavage mittels ELISA nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von vier bis sechs durchgeführten Experimenten. Signifikante Unterschiede der nachgewiesenen Zytokin-Konzentrationen im Vergleich zu Proteinsensibilisierten Tieren, die mit βGal provoziert wurden sind gekennzeichnet (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Unterschiede der Tiere, die mit pCMV-IDO Koimmunisiert wurden zu denen, die das Kontroll-Plasmid zusammen mit Fascin-βGal/pCMV-βGal appliziert bekamen sind gekennzeichnet (+  $p \leq 0,05$ , ++  $p \leq 0,01$ ).



**Abb. 41: Einfluss einer therapeutischen DNA-Immunisierung mit Fascin-βGal/pCMV-βGal und pCMV-IDO auf die Induktion CD8<sup>+</sup> IFN-γ-produzierender zytotoxischer T-Zellen in Lunge und Milz nach intranasaler Provokation mit βGal BALB/c Mäuse (A, B: pFascin-βGal n=16-24) (C, D: pCMV-βGal n=8)** wurden dreimal im Abstand von einer Woche mit 10 μg βGal subkutan sensibilisiert und anschließend dreimal mit Hilfe der Genpistole mit pFascin-βGal/pCMV-βGal zusammen mit einem Kontroll-Plasmid oder pCMV-IDO immunisiert, und mit βGal intranasal provoziert. Kontrollmäuse wurden mit dem Protein sensibilisiert und mit βGal bzw. zur Kontrolle mit PBS behandelt. An Tag 47 wurden die Milzen und Lungen der Tiere isoliert und die Anzahl der IFN-γ produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde mittels CTL-EliSpot ermittelt. Dazu wurden 2x10<sup>5</sup> Zellen in An- (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) des βGal-Peptides TPHPARIGL kultiviert. Nach 20 Stunden erfolgte die Auswertung des Tests. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von vier bis sechs Experimenten. Signifikante Unterschiede der Induktion zytotoxischer T-Zellen im Vergleich zu proteinsensibilisierten mit βGal behandelten Tieren sind gekennzeichnet, (\*p ≤ 0,05, \*\* p ≤ 0,01, \*\*\* p ≤ 0,01). Die Unterschiede zwischen den DNA immunisierten Tieren waren nicht signifikant.

Eine therapeutische DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal führte zusammengefasst zu einer Inhibition der Atemwegshyperreaktivität, die durch eine Koapplikation von pCMV-IDO noch weiter vermindert werden konnte. Ein inhibitorischer Einfluss der biolistischen Immunisierung auf die IgG-Produktion im Serum, die gemessene Zytokin-Konzentration in der bronchoalveolären Lavage und die Induktion CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ -produzierender zytotoxischer T-Zellen in Lunge und Milz konnte bei diesen Experimenten nicht festgestellt werden. Es kam allerdings durch eine therapeutische Koimmunisierung mit pCMV-IDO zur einer Reduktion des Anteils an Lymphozyten und zu einer verminderten Infiltration von Neutrophilen in die Lunge sowie zu einer Inhibition der IFN- $\gamma$ -Produktion durch Zellen in der Lunge.

Eine therapeutische DNA-Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal führte zu einer Inhibition der Atemwegshyperreaktivität, die durch eine Koapplikation von pCMV-IDO nicht weiter reduziert werden konnte. Ein inhibierender Effekt auf die IgG-Produktion im Serum konnte nicht nachgewiesen werden. Eine biolistische Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal führte sogar zu einer Erhöhung der antigenspezifischen IgG-Titer, die durch eine Koapplikation mit pCMV-IDO reduziert werden konnten. Nach der therapeutischen DNA-Immunisierung konnten mehr CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ -produzierende zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden, als nach einer reinen Proteinsensibilisierung. Eine Veränderung der Zellzusammensetzung in der bronchoalveolären Lavage konnte durch eine therapeutische Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal nicht nachgewiesen werden, wobei auch die Koimmunisierung mit pCMV-IDO keinen Einfluss ausübte. Jedoch kam es zu einer Reduktion der IL-5-Konzentration im Überstand der BAL, die jedoch auch durch die Koapplikation von pCMV-IDO nicht verstärkt wurde.

## **4. Diskussion**

Allergische Erkrankungen werden bis heute mit Hilfe der sogenannten Hyposensibilisierung allergenspezifisch therapiert. Hierzu werden den Patienten Allergenextrakte in aufsteigenden Dosen verabreicht. Diese Art der Therapie ist aber zum einen nicht in allen Patienten wirksam und zum anderen wird sie oft aus verschiedenen Gründen von den Patienten abgebrochen. Die Desensibilisierung muss über einen recht langen Zeitraum von drei Jahren durchgeführt werden. Des Weiteren hält die Angst vor Spritzen viele Patienten davon ab, die Therapie zu beenden [Nir *et al.*, 2003].

Es ist daher von großer Bedeutung alternative Therapieformen zur Behandlungen von allergischen Erkrankungen zu etablieren. Eine solche Art der Therapie könnte die biolistische DNA-Immunisierung mit der Genpistole darstellen.

### **4.1 Durch eine biolistische Koimmunisierung mit Kombinations-Vakzinen, bestehend aus pFascin- $\beta$ Gal und einem immunregulatorischen Molekül, können allergenspezifische Immunantworten inhibiert werden**

Einige Studien haben sich bereits mit einer biolistischen DNA-Immunisierung von Mäusen mit allergenkodierender Plasmid-DNA beschäftigt. So verglichen Toda *et al.* 2002 zwei verschiedene Arten der DNA-vermittelten Immuntherapie gegen eine allergenspezifische Reaktion auf die Pollen von *Cryptomeria japonica* miteinander. Dazu verwendeten sie für das Hauptallergen Cry j 1 kodierende Plasmid-DNA für eine DNA-Immunisierung mit der Genpistole und verglichen diese mit einer intramuskulären DNA-Injektion. Durch diese letztere Impfmethode mit Cry j 1 wurde eine Th1-vermittelte Immunantwort induziert. Die intramuskuläre Vakzinierung führte in der Folge zu einer Reduktion der IgE-Produktion in Mäusen, die anschließend mit dem Protein sensibilisiert wurden. Eine biolistische DNA Immunisierung hingegen führte zu einer gemischten Th1/Th2-Antwort, die sowohl durch eine erhöhte IL-4-Produktion als auch eine gesteigerte IFN- $\gamma$ -Produktion gekennzeichnet war. Auf humoraler Ebene führte die biolistische Immunisierung zu einer verstärkten Bildung des Th2-spezifischen Immunglobulins IgG1. Die IgG1-Produktion wurde nach der Proteinsensibilisierung noch verstärkt. Es kam dann auch zu einer starken Produktion von IgE [Toda *et al.*, 2000]. In diesem Fall konnte die DNA-Immunisierung mit Hilfe der Genpistole nicht erfolgreich als Therapie eingesetzt werden.

Ähnliche Resultate beobachteten Scheiblhofer *et al.* 2006 in ihren Studien. Sie untersuchten die Auswirkungen einer protektiven DNA-Immunisierung mit verschiedenen Allergenen im Mausmodell der allergischen Atemwegsinflammation. Hierbei verglichen sie die intradermale Injektion von DNA mit der biolistischen DNA-Immunisierung und verwendeten dazu DNA, die das Birkenpollen-Allergen Bet v 1, das Gräserpollen-Allergen Phl p 5 oder das Modell-Allergen  $\beta$ -Galaktosidase kodierten. Anschließend erfolgten eine Sensibilisierung und eine intranasale Provokation mit dem entsprechenden Allergen. Die biolistische DNA-Vakzinierung resultierte in einer von Th2-Zellen dominierten Immunantwort, die allerdings in Abhängigkeit von dem zur Immunisierung verwendeten Allergen unterschiedlich stark ausgeprägt war. Bet v1 und Phl p 5 induzierten eine stärkere Th2-Antwort als das Modell-Allergen  $\beta$ Gal. Die Vakzinierung mit den allergenkodierenden Plasmid-Vektoren führte in der Folge nicht zu einer Inhibition der durch eine anschließende Protein-Sensibilisierung induzierten IgE-Produktion. Des Weiteren konnte im Vergleich zu nicht behandelten Kontrolltieren die protektive DNA-Vakzinierung mit jedem der drei Antigene eine Infiltration von Eosinophilen in die Lunge, die durch die anschließende Sensibilisierung und Provokation mit dem Allergen induziert wurde, nicht inhibieren. Im Gegensatz zu der biolistischen Applikationsmethode induzierte die intradermale Injektion von Plasmid-DNA eine von Th1-Zellen dominierte Immunantwort. Durch diese Art der Vakzinierung konnten Scheiblhofer *et al.* eine verminderte allergeninduzierte Immunantwort im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung nachweisen [Scheiblhofer *et al.*, 2006].

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

All diese Studien belegen, dass eine biolistische DNA Immunisierung zu einer Th2-vermittelten Immunantwort führt. In all diesen beschriebenen Experimenten konnte kein inhibitorischer Effekt einer biolistischen DNA-Immunisierung auf die allergische Immunantwort nachwiesen werden.

Studien der Klinischen Forschergruppe Allergie zeigten hingegen, dass eine biolistische DNA-Immunisierung durchaus einer allergenspezifischen Th2-Antwort gegensteuern kann. Sudowe *et al.* [2003] verglichen die biolistische DNA-Immunisierung mit  $\beta$ Gal-kodierenden Plasmiden, deren Expression zum einen von dem ubiquitär aktiven CMV-Promotor und zum

anderen vom Fascin-Promotor kontrolliert wurde. Die Verwendung des Fascin-Promotors in den Vektoren ermöglicht eine auf DCs fokussierte Transgenexpression. Aufgrund der aus der Limitierung der Transgenexpression auf DC resultierenden Reduktion des potenziell freigesetzten Antigens wird das Risiko unerwünschter Immunreaktionen wie zum Beispiel anaphylaktischer Reaktionen minimiert [Sudowe *et al.*, 2006]. Während eine biolistische Applikation von pCMV- $\beta$ Gal zu einer gemischten Th1/Th2-Antwort führte, kam es nach einer Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zu einer von Th1-Zellen beherrschten Immunantwort. In weiterführenden Untersuchungen von Zindler *et al.* [2008] wurde darüber hinaus gezeigt, dass eine biolistische DNA-Immunisierung sowohl mit pCMV- $\beta$ Gal als auch mit pFascin- $\beta$ Gal vor einer antigeninduzierten Infiltration von Eosinophilen in die Lunge schützt. Im Gegenzug kam es allerdings in diesen Experimenten zu einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Atemwege. Die in diesem Modell ausgelöste Atemwegshyperreaktivität wurde durch die Vakzinierung nicht inhibiert, allerdings wurde sie anders als in den nicht-vakzinieren Tieren nicht von Th2-Zellen, sondern von Th1- und Tc1-Zellen vermittelt [Zindler *et al.*, 2008].

Diese Ergebnisse gehen konform mit einer Reihe anderer Untersuchungen im Mausmodell der allergeninduzierten Atemwegsinfammation, die ebenfalls zeigen, dass es nicht alleine reicht eine allergische Th2-Immunantwort hin zu einer allergenspezifischen Th1-Antwort zu polarisieren. Diese Th-Zellen können nicht vor einer allergischen Atemwegsinfammation schützen [Hansen *et al.*, 1999]. Hsu *et al.* hingegen zeigten 1996, dass die intradermale Injektion von allergenkodierender Plasmid-DNA zu einer Reduktion der Atemwegshyperreaktivität führt [Hsu *et al.*, 1996]. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Maecker *et al.* durch eine intramuskuläre Vakzinierung mit Plasmid-DNA [Maecker *et al.*, 2001]. Es scheint also eine Rolle zu spielen, über welche Route mit der allergenkodierenden Plasmid-DNA vakziniert wird, um einen inhibitorischen Effekt auf die AHR zu erzielen [Zindler *et al.*, 2008]. Ob die Verschiebung einer allergischen Th2-Antwort hin zu einer Th1-Antwort bei der Kontrolle von Infammationen wirksam ist wird kontrovers diskutiert [Zindler *et al.*, 2008]. So zeigten Takaoka *et al.* [2001], dass der Transfer von Th1-Zellen zu einer Infiltration von Neutrophilen in die Lunge einhergehend mit einer erhöhten AHR führt [Takaoka *et al.*, 2001]. In den Experimenten von Cohn *et al.* hingegen induzierten aktivierte Th1-Zellen eine Rekrutierung von Neutrophilen in die Lunge, induzierten aber keine AHR [Cohn *et al.*, 1998].

Die Nachteile einer DNA-Immunisierung, die die Induktion einer potenten gegenregulatorischen Th1-Antwort in den Vordergrund stellt, legt die Forderung einer

Weiterentwicklung dieser Art der DNA-Immunisierung mit allergenkodierender Plasmid-DNA zur Inhibition allergenspezifischer Th2-vermittelter allergischer Reaktionen nahe. Eine denkbare Möglichkeit in dieser Hinsicht ist die Durchführung einer Vakzinierung mit einer Kombination aus dem allergenkodierenden Plasmid zusammen mit einem immunmodulatorischen Molekül, um auf diese Weise eine allergenspezifische Toleranz zu induzieren. Dadurch könnten sowohl die durch die Sensibilisierung entstehenden Th2-Zellen als auch die potenziell durch die DNA-Immunisierung induzierten Th1-Zellen supprimiert werden.

Maecker *et al.* [1997] verwendeten dieses Modell der DNA-Immunisierung mit Kombinations-Vakzinen. Sie führten eine DNA-Vakzinierung mit Fusionskonstrukten durch. Dazu verwendeten sie OVA-kodierende Plasmide gekoppelt an Gene für Zytokine wie GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-12 oder IL-1 $\beta$ . Eine intramuskuläre Injektion der DNA-Konstrukte führte verglichen mit einer Immunisierung mit dem OVA-Vektor alleine zu einer verminderten zellulären Immunantwort. Eine biolistische Vakzinierung mit OVA-IL-12 und OVA-IL-1 $\beta$  führte zu einer Th1-polarisierten Immunantwort, die gekennzeichnet war durch eine gesteigerte IFN- $\gamma$ -Produktion und wenig IL-4. Die Immunisierung mit OVA-IL-4 hingegen führte zu einer eher Th2-gerichteten Immunantwort und zu einer gesteigerten IL-4-Produktion. [Maecker *et al.*, 1997].

Später zeigten Maecker *et al.* [2001], dass eine Vakzinierung mit einem Fusionskonstrukt bestehend aus OVA und IL-18 nicht nur vor der Entwicklung einer allergeninduzierten Atemwegshyperreaktivität schützt, sondern auch eine bestehende AHR aufhebt. Gleichzeitig kam es zu einer Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Produktion und einer verminderten antigenspezifischen IgE-Produktion. Der schützende Effekt wurde durch IFN- $\gamma$  und CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt. Eine Vakzinierung mit OVA-IL-18 bei Mäusen, bei denen bereits eine AHR vorlag, führte zu einer Verbesserung der Symptome einhergehend mit einer Reduktion der IL-4-Produktion und einem Anstieg von IFN- $\gamma$ . Durch eine Vakzinierung mit OVA alleine konnte dieser Effekt nicht induziert werden [Maecker *et al.* 2001].

Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, eine allergische Immunantwort durch eine Koapplikation von allergenkodierender Plasmid-DNA zusammen mit einem immunregulatorischen Molekül zu beeinflussen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Koapplikation von  $\beta$ Gal zusammen mit IL-10, TGF- $\beta$ 1 oder IDO das Potential hat, allergenspezifische Immunantworten zu inhibieren. Alle drei verwendeten Moleküle sind mit der Induktion von Toleranz assoziiert. IL-10 und TGF- $\beta$  sind beides immunregulatorische Zytokine, die direkt eine Rolle bei der Induktion von Treg



spielen. IL-10-produzierende Tr1-Zellen werden durch die Aktivierung CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Anwesenheit von IL-10 generiert und TGF- $\beta$ -sezernierende Th3-Zellen können durch die Kultur konventioneller T-Zellen mit TGF- $\beta$ , IL-4 und IL-10 induziert werden [Gregori *et al.*, 2010, Groux *et al.*, 1997, Inobe *et al.*, 1998]. IDO hingegen kann durch den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan zu Kynureninen und dem damit einhergehenden Nährstoffmangel zum einen durch die Induktion von T-Zell-Apoptose und zum anderen durch die Induktion von Tregs Toleranz vermitteln [Fallarino *et al.*, 2002, Fallarino *et al.*, 2006]. Die Transfektion der DC mit IL-10, TGF- $\beta$  oder IDO könnte somit einen direkten Effekt auf die T-Zellen haben oder aber über Veränderungen der DC an sich wirken.

In einigen Studien wurde bereits gezeigt, dass IDO einen Einfluss auf Th1- und Th17-vermittelte Erkrankungen hat. So berichten Yan *et al.* [2010], dass IDO einen inhibierenden Effekt auf die Differenzierung von Th1- und Th17-Zellen in der EAE hat. Der durch IDO vermittelte Tryptophan-Abbau aktiviert die GCN2-Kinase ("general control nonrepressed 2"), welche die Th17-Differenzierung inhibiert. Auf die Th1-Zellen wirken der Tryptophanmangel und die gebildeten Kynurenine ebenfalls inhibierend. IDO-defiziente Mäuse entwickelten in den von Yan *et al.* durchgeführten Experimenten eine starke Form der EAE einhergehend mit einer verstärkten Th1- und Th17-Antwort und einem verminderten Vorkommen von Treg. Die Gabe des Tryptophan-Metabolits 3-Hydroxyanthranylsäure verbesserte die EAE-Symptome und führte zu einer Inhibition der Th1- und Th17-Zellen und erhöhte den Anteil an Treg [Yan *et al.*, 2010].

Die Rolle von IDO beim allergischen Asthma hingegen wird kontrovers diskutiert. So zeigten Hayashi *et al.* [2004], dass IDO experimentelles Asthma inhibieren kann. Sie belegten in ihren Studien, dass TLR-4- und TLR-9-Liganden die Expression von IDO, in verschiedenen Organen, induzieren. Die so induzierte pulmonare Expression von IDO war in der Lage ein Th2-vermitteltes experimentelles Asthma zu inhibieren, die Inflammation der Lunge zu unterdrücken und die Entstehung einer Atemwegshyperreaktivität zu verhindern. Die Inhibition der Inflammation könnte auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein. IDO depletiert das Tryptophan in der Umgebung, wodurch verschiedene toxische Metabolite entstehen, die den Zelltod der T-Helferzellen induzieren. Es können auch andere Verbindungen wie z.B. Formylkynurenin entstehen. Diese können Sauerstoffradikale an den Stellen der Entzündungen entfernen. Im Falle der Th2-vermittelten Atemwegsinfektion inhibiert IDO die Bildung des Atemwegskonstriktors 5-Hydroxytryptamin [Hayashi *et al.*, 2004]. Xu *et al.* [2008] hingegen zeigten in ihren Untersuchungen, dass die Expression von IDO durch DC in der Lunge die Th2-Antwort und so die allergische Entzündung der

Atemwege fördert. Sie verwendeten IDO-defiziente Mäuse und konnten keine Beeinträchtigung der Toleranz in den Atemwegen feststellen. Im Gegenteil fanden sie heraus, dass das Fehlen von IDO zu einer signifikanten Inhibition der Ausbildung des allergischen Asthmas führte. So war die Produktion von Th2-Zytokinen stark abgeschwächt, die Produktion von Mucus reduziert und die Atemwegshyperreaktivität und die antigenspezifische Bildung von IgE vermindert. Daraus schlossen sie, dass IDO nicht für die Induktion von Immuntoleranz in den Atemwegen benötigt wird, aber eine wichtige Rolle bei der Ausbildung einer allergischen Atemwegsinfektion spielt. Sie postulieren, dass diese Effekte durch DC der Lunge vermittelt werden, die IDO exprimieren [Xu *et al.*, 2008]. Van der Marel *et al.* [2007] hingegen fanden heraus, dass ein Fehlen von IDO in den DC der drainierenden Lymphknoten der Nase während der intranasalen Gabe von Ovalbumin die antigenspezifische Immuntoleranz, die normalerweise induziert würde, aufhebt. Sie postulieren, dass die Expression von IDO während der intranasalen Antigengabe normalerweise zu einer Induktion regulatorischer T-Zellen führt, die einen Einfluss auf die T-Effektorzellen haben und so Toleranz induzieren. Das Fehlen von IDO führt also demnach zu einer Inhibition der Induktion regulatorischer T-Zellen [Van der Marel *et al.*, 2007]. Die unterschiedlichen Ergebnisse in diesen Experimenten könnten auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen, unter denen sie erhalten wurden, zurückzuführen sein. Außerdem fokussierten sich die verschiedenen Autoren auf die Expression von IDO in unterschiedlichen DC.

Auch für IL-10 und TGF- $\beta$  gibt es bereits zahlreiche Studien, die ihre Wirkung als Immunregulatoren belegen. Fu *et al.* [2006] führten Studien durch, um den Effekt eines Gentransfers über die Atemwege in einem Modell der allergischen Atemwegsinfektion zu untersuchen. Dazu sensibilisierten sie Mäuse durch intraperitoneale Injektionen von OVA gefolgt von einer intranasalen Provokation mit OVA, die zu einer Atemwegsinfektion führte. Eine tägliche lokale Gabe von IL-10- oder TGF- $\beta$ -kodierender Plasmid-DNA in die Trachea bis zu einem Tag vor der Provokation inhibierte die antigeninduzierte Atemwegshyperreaktivität. Die Anzahl an eosinophilen und neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage war ebenfalls reduziert. Hierbei konnte durch die Gabe von IL-10-kodierender DNA ein größerer Effekt erzielt werden als durch die Applikation von TGF- $\beta$ -kodierender DNA [Fu *et al.* 2006].

Für TGF- $\beta$  wurde gezeigt, dass es einen positiven Einfluss auf Autoimmunerkrankungen wie z.B. die Typ1 Diabetes haben kann. Piccirillo *et al.* zeigten 1998, dass TGF- $\beta$ 1 NOD-Mäuse („Nonobese Diabetic“), die eine autoimmune Insulitis und Diabetes entwickeln, vor dieser

Krankheit schützen kann. Sie injizierten diesen Mäusen intramuskulär TGF- $\beta$ -kodierende Plasmid-DNA unter Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors. Diese Behandlung führte zu einer Expression von TGF- $\beta$  durch Muskelzellen. Es kam dadurch außerdem im Vergleich mit Mäusen, die mit einem Kontroll-Plasmid behandelt wurden, zu einer Erhöhung des TGF- $\beta$ -Levels im Plasma. Die sogenannte allergische Reaktion des Spättyps („delayed type hypersensitivity“ DTH) wurde supprimiert und die Entwicklung einer Diabetes und Insulitis in den NOD-Mäusen verhindert [Piccirillo *et al.*, 1998].

Auch auf die Entwicklung einer EAE hat TGF- $\beta$  einen positiven Effekt. Eine Behandlung von Mäusen mit TGF- $\beta$  transduzierten MBP- („myelin basic protein“) spezifischen T-Zellklonen kann vor einer EAE schützen [Chen *et al.*, 1998].

Für IL-10 konnte ebenfalls ein Effekt auf die Induktion einer EAE nachgewiesen werden. Cua *et al.* [1999] zeigten in transgenen Mäusen, die humanes IL-10 unter der Kontrolle eines Klasse II MHC-Promotors exprimieren, dass die Expression von IL-10 vor der Induktion einer EAE schützt. Dieser Schutz wurde durch die Suppression der Funktion autoreaktiver T-Zellen vermittelt [Cua *et al.*, 1999].

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die eben genannten immunmodulatorischen Moleküle zusammen mit  $\beta$ Gal für eine biolistische DNA-Immunisierung ausgewählt. Hierbei wurden in den mit IDO durchgeführten Versuchen sowohl IDO als auch das Antigen unter der Kontrolle des ubiquitären CMV-Promotors und zum anderen unter Kontrolle des DC-spezifischen Fascin Promotors angewandt und miteinander verglichen. Die Verwendung des Fascin-Promotors zur Allergenexpression könnte verschiedene Vorteile gegenüber dem CMV-Promotor aufweisen. Zum einen erlaubt er, dass nur die direkt transfizierten DC  $\beta$ Gal exprimieren. Diese DC exprimieren dann auch immer gleichzeitig das immunmodulatorische Molekül. Andere mit Fascin- $\beta$ Gal transfizierte Zellen können  $\beta$ Gal aufgrund der Verwendung des Fascin-Promotors nicht exprimieren. Die Möglichkeit, dass untransfizierte DC  $\beta$ Gal, welches von anderen Zellen freigesetzt wurde, aufnehmen, ohne dass sie auch gleichzeitig das immunomodulatorische Molekül exprimieren, wird auf diese Weise minimiert. Wird der CMV-Promotor zur biolistischen Transfektion verwendet, werden auch nicht-DC mit  $\beta$ Gal transfiziert mit der Folge, dass DC  $\beta$ Gal, das von anderen Körperzellen freigesetzt wird, aufnehmen und es prozessieren. Diese DC präsentieren dann T-Zellen das relevante  $\beta$ Gal-Peptid über MHC-II-Moleküle und es kommt zu einer Aktivierung und Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen und somit zu einer Aktivierung des Immunsystems. Ein weiterer Effekt, der eine Rolle spielen könnte, wäre die Kreuzpräsentation von Antigen. So könnte sezerniertes  $\beta$ Gal, welches von transfizierten nicht-DC, wie z.B. Keratinozyten, in die

Umgebung abgegeben würde, von den DC aufgenommen und über MHC-I-Moleküle CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden. Diese DC würden ebenfalls nicht gleichzeitig das verwendete immunomodulatorische Moleküle exprimieren. Auf diese Weise könnte es zu einer Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen kommen.

Es könnte daher von Bedeutung sein, dass das Antigen zusammen mit dem immunomodulatorischen Molekül in derselben Zelle exprimiert wird, um Toleranz gegen das Antigen zu induzieren. Hierzu ist es zum einen wichtig, dass das  $\beta$ Gal-Plasmid und das IDO-, IL-10- oder TGF- $\beta$ -Konstrukt bei der biolistischen Transfektion zusammen auf ein und demselben Goldpartikel gekoppelt sind. Zum anderen stellt die Verwendung von Fascin- $\beta$ Gal sicher, dass keine nicht-DC das Antigen in Abwesenheit des immunomodulatorischen Moleküls exprimieren.

Ob das immunomodulatorische Molekül in einer hohen oder niedrigen Dosis vorhanden sein muss, konnte so ebenfalls getestet werden. Im Falle der Versuche, die mit einer Kombination von  $\beta$ Gal und IDO durchgeführt wurden, sollte getestet werden, ob es eine Rolle spielt, ob die Expression des immunomodulatorischen Moleküls auf DC beschränkt ist oder mit Hilfe des CMV-Promotors in allen Zellen stattfindet. Hierbei exprimieren nach Transfektion mit pFascin-IDO deutlich weniger Zellen das Transgen als nach Transfektion mit pCMV-IDO.

Die Resultate der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente weisen darauf hin, dass die Kombinationsvakzine bestehend aus pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IDO, pCMV-TGF- $\beta$  und pCMV-IL-10 einen inhibierenden Einfluss auf die  $\beta$ Gal spezifische Immunantwort haben.

Zunächst wurde die IDO-kodierende Plasmid-DNA auf ihre Funktionalität getestet. Hierzu wurden die Konzentration des durch die IDO-Aktivität abgebauten Tryptophans und die der dadurch entstandenen Kynurenine bestimmt. Hierbei waren erste Anzeichen dafür sichtbar, dass der CMV-Promotor, wie erwartet wesentlich stärker ist als der Fascin-Promotor. Der gemessene Tryptophan-Abbau und die Akkumulation von Kynureninen in den Überständen von Zellkulturen, die mit pCMV-IDO transfiziert wurden, war deutlich größer als der Effekt nach Transfektion mit pFascin-IDO. Die IL-10- und TGF- $\beta$ -kodierende Plasmid-DNA wurde in vorherigen Studien bereits auf ihre Funktionalität hin untersucht. Diese konnten daher direkt in die Versuche eingesetzt werden.

Eine Koapplikation von pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IL-10, pCMV-TGF- $\beta$  oder pCMV-IDO zeigte eine Verbesserung des Therapieerfolges verglichen mit einer Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal alleine. So führte die Immunisierung mit den Kombinations-Vakzinen zu

einer Inhibition der antigenspezifischen Antikörper im Serum im Vergleich zu einer Vakzinierung mit pFascin $\beta$ Gal in Kombination mit einem Kontroll-Plasmid. Der geringste Einfluss auf die Immunglobulin-Produktion wurde hierbei durch eine Koimmunisierung mit pCMV-TGF- $\beta$  erzielt. Eine Inhibition der Antikörperproduktion konnte nicht beobachtet werden, wenn das immunmodulatorische Molekül, in diesem Fall IDO, unter Kontrolle des Fascin-Promotors in Kombination mit pFascin- $\beta$ Gal verwendet wurde. Eine Koapplikation von pCMV- $\beta$ Gal mit den beiden IDO-DNA-Konstrukten zeigte keinen Therapieerfolg.

Durch die Verwendung der Kombinations-Vakzine könnte es zur Induktion einer weniger starken Immunantwort aufgrund der immunregulatorischen Moleküle und somit zu einer schwächeren Aktivierung der B-Zellen kommen. Die reduzierte Bildung von Immunglobulinen könnte also darauf zurückzuführen sein, dass durch die Koimmunisierung eine abgemilderte Immunantwort induziert wird, verglichen mit Mäusen, die mit  $\beta$ Gal und einem Kontroll-Plasmid immunisiert wurden.

Eine weitere Rolle könnte die Induktion von Treg spielen. Treg können auch einen Einfluss auf die humorale Immunantwort und somit auch auf B-Zellen haben. Sie können deren Aktivierung direkt inhibieren [Jang *et al.*, 2011]. Dies könnte eine Erklärung für die reduzierten Immunglobulin-Titer in den Mäusen nach der Koexpression von IL-10, TGF- $\beta$  oder IDO sein.

Im Fall von IDO könnte auch die Apoptose von B-Zellen eine Rolle spielen. Die durch IDO vermittelte Akkumulation von Tryptophan-Metaboliten kann auch den Zelltod von B-Zellen induzieren [Grohmann *et al.*, 2003]. Dieser Effekt könnte auch einen Einfluss auf die Produktion von IgG haben. Anhand der durchgeführten Versuche konnte allerdings nicht ermittelt werden, worauf die verminderte Produktion von Immunglobulinen zurückzuführen war.

Die Ergebnisse von Sudowe *et al.* [2003] konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Eine biolistische DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal führte zu einer Th1-polarisierten Immunantwort, die gekennzeichnet war durch ein verstärktes Vorkommen von IgG2a im Serum der immunisierten Mäuse und durch eine erhöhte Produktion von IFN- $\gamma$  durch stimulierte Th1-Zellen der Milz und der Lymphknoten. Die IFN- $\gamma$ -Produktion war in Mäusen, die eine Koapplikation mit pCMV-IL-10, pCMV-TGF- $\beta$  und pCMV-IDO erhielten, vermindert im Vergleich mit Tieren, die mit einem Kontroll-Plasmid in Kombination mit pFascin- $\beta$ Gal immunisiert wurden. Hierbei zeigte eine Koapplikation mit pCMV-TGF- $\beta$  den geringsten Einfluss. Eine Koapplikation mit pFascin-IDO hatte keinen schützenden Effekt. Hier scheinen die Menge der gebildeten IDO und die daraus resultierenden Veränderungen

wie der Abbau von Tryptophan und die Akkumulation von Kynureninen nicht ausreichen, um auf die T-Zellen zu wirken.

Verglichen mit den Ergebnissen nach Verwendung von pFascin- $\beta$ Gal kam es nach einer biolistischen Vakzinierung mit pCMV- $\beta$ Gal, wie von Sudowe *et al.* [2003] bereits beschrieben, zur Induktion einer gemischten Th1/Th2-Immunantwort. Diese war gekennzeichnet durch die Bildung des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$  und des Th2-Zytokins IL-5, wobei in den Milzen und Lymphknoten IFN- $\gamma$  das vorherrschende Zytokin war. In den Lymphknoten wurden aber auch größere Mengen an IL-5 von den T-Zellen produziert. Eine Reduktion der Zytokin-Produktion konnte nur durch eine Immunisierung mit einer Kombination aus pCMV- $\beta$ Gal und pCMV-IDO erzielt werden. Allerdings war nur die IL-5-Produktion in den stimulierten Lymphknoten inhibiert.

Im Fall von IDO könnten sowohl der Abbau von Tryptophan als auch die Akkumulation von Kynureninen einen Einfluss auf T-Zellen haben [Liu *et al.*, 2009]. Sie verursachen Stress und einen Mangel an Nährstoffen und reduzieren so die T-Zellfunktion, was einen induzierten Zelltod zur Folge haben kann [Stone *et al.*, 2002, Fallarino *et al.*, 2006, Munn und Mellor, 2007]. T-Zellen, die einem Tryptophan-Mangel ausgesetzt werden, sind sensitiv für Apoptose [Munn *et al.*, 1998]. Die Apoptose kann in aktivierten, nicht aber in ruhenden T-Zellen induziert werden [Hill *et al.*, 2007]. Eine weitere Rolle könnte die durch die Metabolite des Tryptophan-Abbaus vermittelte Apoptose spielen [Fallarino *et al.*, 2002]. Es gibt unterschiedliche Meinungen dazu, ob die T-Zell-Apoptose durch den Mangel an Tryptophan induziert wird oder die gebildeten toxischen Kynurenine dafür verantwortlich sind. Durch die Expression von IDO können aber auch direkt regulatorische T-Zellen induziert werden. Hierbei werden naive  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen in  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  regulatorische T-Zellen transformiert [Fallarino *et al.*, 2003]. Diese könnten auch die verminderte T-Zellantwort vermitteln.

Der Einfluss von IL-10 auf T-Zellen ist vielfältig. IL-10 induziert die Differenzierung von  $CD4^+$  Tr1-Zellen, die einen Einfluss auf die Kontrolle von Immunantworten haben [Groux und Cottrez, 2003]. Diese Tr1-Zellen sind antigenspezifische anerge T-Zellen, die die T-Zell-Proliferation Zell-Kontaktvermittelt inhibieren und IL-10 produzieren [Gregori *et al.*, 2010]. IL-10 induziert antigenspezifisch Anergie in  $CD4^+$  T-Zellen [Groux *et al.*, 1999]. Des Weiteren inhibiert IL-10 die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren durch DC, Monozyten und Makrophagen und vermindert die Antigenpräsentation über die Herabregulierung der Expression von MHC-II sowie von kostimulatorischen und Adhäsions-Molekülen. IL-10 inhibiert die Synthese von IL-12 und erschwert so die Entwicklung einer

Th1-Antwort. Außerdem reduziert es die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und auch deren Zytokin-Produktion. So inhibiert IL-10 die IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion von Th1-Zellen und die IL-4- und IL-5-Produktion von Th2-Zellen [Sabat *et al.*, 2010, Groux und Cottrez, 2003, Groux *et al.*, 1999].

TGF- $\beta$  beeinflusst viele Zellen des Immunsystems wie auch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Es hat einen Effekt auf verschiedene Prozesse wie die T-Zell-Proliferation, die T-Zell-Apoptose und die T-Zell-Differenzierung. Der Effekt von TGF- $\beta$  ist abhängig von verschiedenen Faktoren, so z.B. von dem Differenzierungsstatus der Zelle und der Anwesenheit anderer Zytokine. TGF- $\beta$  inhibiert lediglich die Proliferation und Zytokin-Sekretion ruhender CD4<sup>+</sup> T-Zellen, hat aber keinen Effekt auf aktivierte T-Zellen. TGF- $\beta$  inhibiert die Proliferation von Th1- und auch Th2-Zellen [Cottrez und Groux, 2001]. Des Weiteren inhibiert TGF- $\beta$  die Differenzierung naiver T-Zellen zu Effektorzellen [Gorelik *et al.*, 2002]. TGF- $\beta$  kann die Proliferation inhibieren, indem es verschiedene Gene, die eine Rolle bei der Zellzyklus-Kontrolle spielen, blockiert [Das und Levine, 2008]. Es beeinflusst außerdem die Funktion von T-Helferzellen durch die Herabregulierung von T-bet und GATA-3, den spezifischen Transkriptionsfaktoren von Th1- und Th2-Zellen [Belladonna *et al.*, 2008, Gorelik *et al.*, 2002]. Außerdem inhibiert TGF- $\beta$  die IL-2-Produktion. Es konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  auch bei normaler T-Zell-Proliferation die Zytokin-Produktion beeinflusst [Das und Levine, 2008]. TGF- $\beta$  hat des Weiteren auch einen Effekt auf DC. Seine Anwesenheit inhibiert die Aktivierung und Ausreifung von DC *in vitro*. TGF- $\beta$ 1 inhibiert die Aufregulierung kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche von DC und reduziert deren Fähigkeit Antigene zu präsentieren [Strobel und Knapp, 1999].

Es wurde beschrieben, dass eine biolistische DNA-Immunisierung mit allergenkodierender Plasmid-DNA zur Induktion zytotoxischer T-Zellen führt [Condon *et al.*, 1996]. Durch eine Koimmunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IL10 oder pCMV-IDO wurden weniger IFN- $\gamma$ -produzierende zytotoxische T-Zellen induziert, verglichen mit der Immunisierung mit einem Kontroll-Plasmid. Eine Koapplikation mit pCMV-TGF- $\beta$  hingegen hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der zytotoxischen T-Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe. In Übereinstimmung mit den Studien von Zindler *et al.* [2008] zeigte sich, dass durch eine biolistische Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal eine höhere Frequenz an zytotoxischen T-Zellen induziert wird als durch Applikation von pFascin- $\beta$ Gal.

Es zeigte sich nach einer Vakzinierung von pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit IDO kein inhibitorischer Effekt. Die Anzahl CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen war hierbei in allen

behandelten Gruppen gleich. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass es wichtig ist die  $\beta$ Gal-Expression auf DC zu beschränken.

IDO inhibiert zum einen die Degranulation  $CD8^+$  T-Zellen und inhibiert somit deren zytotoxische Funktion. Zum anderen hemmt die Expression von IDO die Proliferation und Zytokin-Produktion von zytotoxischen T Zellen. Die Inhibition der Zellproliferation, die durch die Anhäufung bestimmter Tryptophan-Katabolite vermittelt wird, ist spezifisch für Zellen, die aktiviert werden. Ruhende Zellen sind nicht betroffen [Frumento *et al.*, 2002].

TGF- $\beta$  kann die Aktivierung und Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen inhibieren [Belladonna *et al.*, 2008]. Allerdings wirkt TGF- $\beta$  nur auf naive  $CD8^+$  T-Zellen inhibitorisch. Bei aktivierten T-Zellen hingegen fördert TGF- $\beta$  deren Überleben und Wachstum. Der Effekt von TGF- $\beta$  auf T-Zellen ist also abhängig von ihrem Differenzierungsstatus und ihrer Aktivierung [Filippi *et al.*, 2008]. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass TGF- $\beta$  in den zuvor beschriebenen Versuchen keinen Effekt auf die Anzahl IFN- $\gamma$ -produzierender zytotoxischer T-Zellen hat. Liegen aktivierte  $CD8^+$  T-Zellen vor, fördert TGF- $\beta$  deren Proliferation und sichert ihr Überleben.

IL-10 selbst hat keinen direkten inhibitorischen Effekt auf  $CD8^+$  T-Zellen [Sabat *et al.*, 2010]. Groux *et al.* [1999] beschrieben, dass IL-10 aktivierte  $CD8^+$  T-Zellen stimuliert. Es ist daher wahrscheinlich, dass der Effekt einer Koimmunisierung mit IL-10 durch die Treg, die durch IL-10 induziert werden, vermittelt wird. Es wurde bereits gezeigt, dass Tregs die Entstehung zytotoxischer T-Zellen supprimieren können [Chung *et al.*, 2009].

Zindler *et al.* [2008] zeigten, dass eine DNA-Immunisierung mit  $\beta$ Gal-Expression unter Kontrolle des CMV- oder des Fascin-Promotors eine Th2-vermittelte Atemwegsreaktivität inhibiert. In derart immunisierten Mäusen entwickelte sich allerdings nach einer intranasalen Provokation mit dem Allergen eine Th1-vermittelte Atemwegsinflammation, die begleitet war durch eine Infiltration von Neutrophilen in die Lunge.

Es war daher wichtig in weiteren Versuchen zu klären, ob eine durch die DNA-Immunisierung entstehende Th1-vermittelte Atemwegshyperreaktivität durch eine Kovakzinierung mit IDO, TGF- $\beta$  oder IL-10 inhibiert werden kann.

Den größten inhibitorischen Effekt auf die Atemwegshyperreaktivität zeigte eine Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IDO. Koapplikationen mit pCMV-IL-10, pCMV-TGF- $\beta$  und auch pFascin-IDO zeigten ebenfalls Effekte, die allerdings verglichen mit denen nach Koapplikation von pCMV-IDO schwächer waren. Auch hier war es wieder von Bedeutung eine möglichst hohe Expressionsrate des immunomodulatorischen Moleküls zu



erzielen. Dies wird an der Tatsache deutlich, dass pCMV-IDO wesentlich effektiver die Ausbildung einer Atemwegshyperreaktivität inhibiert als pFascin-IDO. Weshalb IL-10 und TGF- $\beta$  keinen vergleichbaren Therapie-Erfolg zeigen wie IDO ist unklar, zumal auf zellulärer Ebene teilweise größere Effekte durch IL-10 und TGF- $\beta$  erzielt werden konnten. Durch eine Koexpression von pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IL-10 oder pCMV-TGF- $\beta$  kam es zu einer Inhibition des Anteils an Lymphozyten in der Lunge. Die Expression von IDO hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Anzahl der Lymphozyten in der Lunge. So wurde der Anteil an Lymphozyten durch pCMV-IDO reduziert, allerdings nicht so effizient wie durch pCMV-IL-10 oder pCMV-TGF- $\beta$ . Es könnte sein, dass IDO in diesem Modell in der Lage ist mit einer größeren Effizienz Treg zu induzieren als IL-10 oder TGF- $\beta$ . Es könnte aber auch sein, dass IDO über zellvermittelte Effekte wirkt. Es wäre aber auch möglich, dass es sich um eine Kombination aus beiden Effekten handelt.

Die etwas geringere Anzahl an Lymphozyten in der Lunge könnte darauf zurückzuführen sein, dass der durch die IDO-Expression vermittelte Tryptophan-Abbau und die daraus resultierende Akkumulation von Kynureninen zur Induktion von T-Zell-Apoptose führt. Dies konnte allerdings in diesen Experimenten nicht aufgeklärt werden. Einige Studien belegen aber, dass die Expression von IDO die T-Zell-Apoptose fördert. Ob T-Zellen durch den Mangel der essentiellen Aminosäure Tryptophan oder durch die Akkumulation der toxischen und antiproliferativ wirkenden Metabolite von Tryptophan in Apoptose gehen, ist hingegen noch nicht geklärt [Munn *et al.*, 1998, Terness *et al.*, 2002, Fallarino *et al.*, 2002]. IL-10 und TGF- $\beta$  inhibieren beide wie schon beschrieben die Proliferation von T-Zellen [Cottrez und Groux, 2001, Groux und Cottrez, 2003]. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb die Anzahl der Lymphozyten in der Lunge durch diese beiden Moleküle so stark inhibiert wird.

Die Resultate der durchgeführten Experimente zeigten, dass es wichtig ist, die Allergen-Expression auf DC zu beschränken und zu gewährleisten, dass alle DC, die mit dem Allergen transfiziert wurden, gleichzeitig auch das immunregulatorische Molekül exprimieren. Dies wurde deutlich, da durch eine Koexpression von pCMV- $\beta$ Gal zusammen mit IDO keine so starke Inhibition der Atemwegshyperreaktivität zu erreichen war wie nach einer Koimmunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal.

Der von Zindler *et al.* [2008] beschriebene Effekt einer vermehrten Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Lunge wurde in dieser Arbeit bestätigt. Eine Koimmunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal und auch pCMV- $\beta$ Gal führte zu einer erhöhten Infiltration von Neutrophilen in die Lunge nach Provokation mit dem Allergen. Es wurden hingegen kaum Eosinophile in der Lunge nachgewiesen. Eine wichtige Rolle bei der

Entwicklung, Rekrutierung und Migration von Eosinophilen spielt das Th2-Zytokin IL-5 [Bharadwaj *et al.*, 2007]. Da es durch die DNA-Immunisierung mit Fascin- $\beta$ Gal zu einer reinen Th1- und mit pCMV- $\beta$ Gal zu einer gemischten Th1/Th2-Immunantwort kommt, spielt IL-5 hierbei keine so entscheidende Rolle und es werden daher nur wenige Eosinophile in die Lunge rekrutiert.

Auf zellulärer Ebene scheint die Koapplikation von IL-10 und TGF- $\beta$  einen größeren Effekt zu haben als die von IDO, da pCMV-IL-10 und pCMV-TGF- $\beta$  die Einwanderung von Neutrophilen in die Lunge stärker inhibieren als pCMV-IDO. Eine Koapplikation von pFascin-IDO zeigte auch hier keinen Effekt.

Für IL-10 wurde gezeigt, dass es einen inhibitorischen Einfluss auf die Neutrophile hat. IL-10 reduziert die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren durch Neutrophile. Des Weiteren inhibiert IL-10 die Sekretion verschiedener Chemokine und reduziert so die Rekrutierung von Neutrophilen [Zhou *et al.*, 2005, Lewkowicz *et al.*, 2006, Sabat *et al.*, 2010]. Es wurde ebenfalls bereits gezeigt, dass eine Überexpression von IDO die Rekrutierung von Neutrophilen in die Lunge im Asthma-Modell supprimiert [Liu *et al.*, 2006]. Durch die Induktion von Treg durch IL-10, TGF- $\beta$  und IDO kann ebenfalls ein Effekt auf Neutrophile vermittelt werden. Es werden weniger Neutrophile in die Lunge rekrutiert. Treg können auch die Akkumulation von Neutrophilen an der Stelle der Inflammation vermindern und haben einen Einfluss auf deren Überleben. So induzieren Treg Apoptose von neutrophilen Granulozyten [Richards *et al.*, 2010]. Außerdem beeinflussen Treg die Funktion von Neutrophilen und supprimieren deren Aktivität *in vitro* und können so Entzündungen entgegenwirken [Lewkowicz *et al.*, 2006, Richards *et al.*, 2010]. Ein weiterer kritischer Faktor sind Immunglobuline. In den Tieren, die mit den Kombinations-Vakzinen bestehend aus pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IDO, pCMV-IL-10 oder pCMV-TGF- $\beta$  immunisiert wurden, wurde ein vermindertes IgG-Niveau im Serum nachgewiesen. IgG wirkt stimulierend auf Neutrophile [Pankhurst *et al.*, 2011]. Eine reduzierte IgG-Produktion resultiert also in einer inhibierten Neutrophilen-Stimulation.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es eine Rolle für den Erfolg der Vakzinierung zu spielen scheint, welcher Promotor für die Expression des Allergens aber auch des immunomodulatorischen Moleküls verwendet wird. Die Allergenexpression muss mit Hilfe des Fascin-Promotors auf DC beschränkt sein. Durch die Kombination mit dem zweiten verwendeten Molekül wird eine Aktivierung des Immunsystems inhibiert und ein eher

tolerogener Zustand induziert. Die Transgen-Expression des zweiten, mit Toleranz-assoziierten Moleküls, sollte aufgrund der besseren Wirksamkeit nicht limitiert exprimiert werden. Es empfiehlt sich daher die Verwendung des CMV-Promotors, der die Expression nicht einschränkt und so ermöglicht, dass große Mengen an IDO, TGF- $\beta$  oder IL-10 gebildet werden können.

In den zuvor diskutierten Versuchen zeigte sich außerdem, dass IL-10 und IDO einen größeren Effekt bei der DNA-Immunisierung zu haben scheinen als TGF- $\beta$ .

## **4.2 Nach einer biolistischen DNA-Immunisierung können keine regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden**

Ob bei der DNA Immunisierung mit IDO, IL-10 und TGF- $\beta$  regulatorische T-Zellen entstehen, welche die beobachteten inhibitorischen Effekte vermitteln, geht aus den zuvor beschriebenen Experimenten nicht hervor. Im Fall einer Koimmunisierung von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO wurde dies nach der Immunisierung mit aufgereinigten T-Zellen überprüft. Allerdings konnten hierbei weder durchflusszytometrisch noch mittels RNA-Expressionsanalysen eindeutig Tregs nachgewiesen werden. Es ist aber durchaus möglich, dass diese in so geringen Mengen induziert werden, dass sie mit den durchgeführten Methoden nicht nachgewiesen werden konnten. Daher wurden in weiterführenden Experimenten mit IDO, IL-10 und TGF- $\beta$  untersucht, ob durch die DNA-Vakzinierung Treg entstehen, die einen Effekt auf eine nachfolgende Proteinsensibilisierung haben. Hierbei wurde die DNA-Immunisierung protektiv eingesetzt. Potentiell entstehende Treg könnten in diesem Modell Toleranz induzieren und so die durch die Sensibilisierung induzierte Immunantwort inhibieren.

## **4.3 Eine protektive antigenspezifische DNA-Immunisierung in Verbindung mit pCMV-IL-10 hat einen inhibitorischen Effekt auf die Entwicklung einer Atemwegsreaktivität**

Der Einfluss der durch eine DNA-Immunisierung entstandenen Modifikationen, wie z.B. die Entstehung regulatorischer T-Zellen, kann im Modell der allergeninduzierten

Atemwegsentzündung untersucht werden. Hierzu erfolgt nach der DNA-Immunisierung durch subkutane Injektionen des  $\beta$ Gal-Proteins eine Sensibilisierung. Im Anschluss daran wurde ermittelt, ob die prophylaktische biolistische Immunisierung mit dem Vakzin pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IL-10, pCMV-TGF- $\beta$  oder pCMV- bzw. pFascin-IDO einen Einfluss auf die Stärke und Art der resultierenden Immunantwort hat und ob die durch Th2-Zellen vermittelte Immunantwort entsprechend durch die Vakzinierung mit den immunregulatorischen Molekülen beeinflusst werden kann. Es wurde daher untersucht, ob im Vergleich zu der Koimmunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit einem Kontroll-Plasmid die Koimmunisierung mit den immunmodulatorischen Molekülen einen inhibierenden Effekt auf die Immunglobulin- und Zytokin-Produktion und auf die Induktion zytotoxischer T-Zellen hat. Des Weiteren wurde im Modell der allergischen Atemwegsinflammation untersucht, ob die Entwicklung einer Atemwegshyperreaktivität und die zelluläre Zusammensetzung in der BAL beeinflusst werden.

Die Versuche zur protektiven Vakzinierung wurden nur noch mit den Plasmiden, die  $\beta$ Gal unter der Kontrolle des Fascin-Promotors exprimieren, durchgeführt, da sich in den vorhergegangenen Experimenten herausgestellt hatte, dass es von essentieller Bedeutung ist die Allergenexpression auf solche Dendritische Zellen zu beschränken, die auch gleichzeitig mit dem immunmodulatorischen Molekül transfiziert wurden. IDO wurde sowohl unter der Kontrolle des CMV- als auch des Fascin-Promotors für die protektive Vakzinierung eingesetzt. Es zeigte sich zwar in den vorherigen Experimenten, dass eine vermehrte Produktion von IDO, die durch den CMV-Promotor gewährleistet wurde effektiver war als eine Beschränkung der IDO-Expression auf Dendritische Zellen mit Hilfe des Fascin-Promotors. Da aber bei der Verwendung von pFascin-IDO ein inhibierender Effekt auf die Entwicklung einer Atemwegshyperreaktivität zu sehen war, wurde das Kombinations-Vakzin bestehend aus Fascin- $\beta$ Gal und Fascin-IDO im nächsten Versuch ebenfalls auf seine Wirkung im protektiven Modell der Typ-I-Allergie getestet.

Ludwig-Portugall *et al.* [2004] zeigten bereits, dass eine prophylaktische DNA-Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal, gefolgt von einer Proteinsensibilisierung, die antigenspezifische IgE- und IgG1-Produktion hemmt. Des Weiteren kam es bei ihren Untersuchungen zu einer Verschiebung der allergischen Th2-Immunantwort hin zu einer gemischten Th1/Th2-Antwort [Ludwig-Portugall *et al.* 2004].

Der Einfluss der DNA-Immunisierung auf die IgE-Produktion wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Im Gegensatz zu der Arbeit von Ludwig-Portugall *et al.*, in der die Mäuse intraperitoneal mit  $\beta$ Gal, adsorbiert an den Wirkungsverstärker Aluminiumhydroxid,

sensibilisiert wurden, was zu einer starken IgE-Produktion führte, wurde in dieser Arbeit lediglich dreimalig subkutan  $\beta$ Gal injiziert, in dessen Folge kaum IgE im Serum der Mäuse nachgewiesen werden konnte. Die Bestimmung des Effektes einer DNA-Immunisierung auf die allergenspezifische IgE-Produktion gestaltete sich somit aufgrund der niedrigen IgE-Titer, die bereits in den Kontrolltieren vorlagen, als schwierig.

Die subkutane Sensibilisierung mit  $\beta$ Gal führt genau wie die intraperitoneale Gabe zur Etablierung einer distinkten Th2-Immunantwort. Ein deutliches Indiz dafür war das im Vergleich zu den anderen Antikörper-Subklassen deutlich erhöhte Vorkommen von IgG1 im Serum der behandelten Mäuse. Eine prophylaktische biolistische DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal, die in dieser Arbeit zusammen mit einem Kontroll-Plasmid durchgeführt wurde resultierte, wie schon von Ludwig-Portugall *et al.* beobachtet, in einer Verschiebung der Dominanz der Th2-Tellen hin zu einer gemischten Immunantwort. So wurde mit Th2-Antworten assoziiertes IgG1 und mit Th1-Antworten assoziiertes IgG2a in etwa gleichen Mengen im Serum dieser Mäuse, nachgewiesen. Durch eine protektive DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IL-10 und pCMV-TGF- $\beta$  waren die IgG-Titer im Serum der Mäuse unbeeinflusst im Vergleich zu den Kontrolltieren. Eine Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pFascin-IDO hingegen führte zu einer Inhibition der IgG1- und IgG2a-Synthese. Hierbei war die Inhibition von IgG2a noch ausgeprägter als die von IgG1. Eine Koapplikation von pCMV-IDO und pFascin- $\beta$ Gal inhibierte die IgG2a-Produktion noch stärker im Vergleich zu einer Koimmunisierung mit pFascin-IDO. Es wurde allerdings entgegen den Erwartungen mehr IgG1 nachgewiesen im Vergleich mit Tieren, die mit pFascin-IDO immunisiert wurden. Anhand der IgG-Immunantwort konnte also nachgewiesen werden, dass nicht mehr eine reine Th1-Immunantwort vorlag. Außerdem war die DNA-Immunisierung nicht in der Lage den Effekt der Proteinsensibilisierung zu überkommen. Möglicherweise entstehen durch die protektive Immunisierung mit pCMV-IL-10 und pCMV-TGF- $\beta$  keine Tregs, die einen länger andauernden immunmodulatorischen Effekt aufweisen. Die Expression von IDO infolge der DNA-Immunisierung hat im Gegenteil dazu einen Effekt auf die Antikörper-Produktion, wobei allerdings in diesem Zusammenhang nicht geklärt wurde, ob die beobachtete Suppression zellvermittelt durch die Induktion der Apoptose der B-Zellen oder durch die Induktion regulatorischer T-Zellen vermittelt wird. Die Inhibition der Antikörperproduktion könnte auch durch eine Kombination aus beiden Effekten vermittelt werden. Die Tatsache, dass die Vakzinierung mit pFascin-IDO einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die IgG1-Produktion im Serum als mit pCMV-IDO hatte ist überraschend und kann nicht abschließend erklärt werden.

Auf Ebene der Zytokin-Produktion wurde nach der Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IL-10, pCMV-TGF- $\beta$ , pCMV-IDO oder pFascin-IDO im Vergleich zu den Kontrollmäusen kein länger anhaltender inhibitorischer Effekt nachgewiesen. Es wurde allerdings festgestellt, dass nicht mehr eine reine Th1-Antwort vorlag, wie bei Mäusen, die nur mit Plasmid-DNA immunisiert wurden. Der schon anhand der Antikörper-Produktion beobachtete Effekt der Verschiebung der Immunantwort hin zu einer gemischten Th1/Th2-Antwort wurde auch aufgrund der Zytokin-Produktion der T-Zellen in der Milz und den Lymphknoten aufgezeigt. Die T-Zellen produzierten nach ihrer antigenspezifischen Stimulation sowohl das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  als auch das Th2-Zytokin IL-5.

In allen Tieren, die mit einer Kombination aus pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit einem immunregulatorischen Molekül mit Hilfe der Genpistole immunisiert wurden, wurde eine geringere Anzahl zytotoxischer T-Zellen nachgewiesen als in den Tieren, die mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit dem Kontroll-Plasmid immunisiert wurden. Der stärkste Effekt wurde hierbei durch das Kombinationsvakzin pFascin- $\beta$ Gal mit pCMV-IDO erzielt. Es lässt sich also partiell eine Immunsuppression bewirken, die aber nicht alle beteiligten Komponenten der zellulären Immunantwort umfasst.

Eine weitere wichtige Frage war auch, ob die prophylaktische DNA-Immunisierung einen Einfluss auf die immunpathologischen Effekte in der Lunge hat. Die Entwicklung einer Atemwegshyperreaktivität in Folge einer lokalen Provokation der Lunge mit dem Antigen wurde, lediglich durch eine Koapplikation mit pCMV-IL-10 signifikant beeinflusst. Bei solchermaßen vakzinierten Tieren wurde verglichen mit den biolistisch immunisierten Kontrolltieren eine geringere Infiltration von Neutrophilen als Reaktion auf die Antigenprovokation nachgewiesen.

Die durch die intranasale Provokation induzierte Atemwegsreaktivität bei den prophylaktisch immunisierten Tieren, scheint Th2-vermittelt zu sein. Diese Hypothese lässt sich darauf stützen, dass es zu einem Erhöhten Vorkommen an Eosinophilen in der Lunge kommt, die charakteristisch sind für eine Th2-Antwort. Die für eine Th1-Antwort typischen Neutrophilen kommen vergleichsweise nur mit einem geringen Anteil vor. Die DNA-Immunisierung hatte einen inhibierenden Einfluss auf die Eosinophilie in der Lunge. So kam es verglichen mit proteinsensibilisierten positiven Kontrolltieren zu einer geringeren Einwanderung von eosinophilen Granulozyten. Eine Koimmunisierung mit IL-10, TGF- $\beta$  oder IDO hatte hierbei keinen weiteren Einfluss. Es spielte also keine Rolle, ob zusätzlich zu pFascin- $\beta$ Gal noch mit einem immunmodulatorischen Molekül vakziniert wurde.

Eine reine Proteinsensibilisierung führte nach anschließender lokaler Provokation überwiegend zu einer Produktion des Th2-Zytokins IL-5 durch die Zellen in der Lunge. In den Überständen der BAL von biolistisch immunisierten Kontrollmäusen hingegen wurde sowohl das Th2-Zytokin IL-5 als auch das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  in deutlichen Mengen nachgewiesen, wobei die IL-5-Produktion im Vergleich zu den nicht vakzinierten Tieren vermindert war. Auch dies lässt sich wieder als Indiz interpretieren, dass durch die prophylaktische DNA-Immunisierung mit dem Antigen nach der darauf folgenden Proteinsensibilisierung eine gemischte T-Zellantwort ausgelöst wird. Die Koimmunisierung mit IL-10-, TGF- $\beta$ - oder IDO-kodierender Plasmid-DNA resultierte in keiner stärkeren Inhibition der IL-5-Produktion. Die IFN- $\gamma$ -Konzentration in der BAL hingegen wurde durch die Koexpression dieser Moleküle vermindert. Eine Koapplikation von pCMV-IL-10 hatte in dieser Hinsicht einen größeren Effekt als eine Koapplikation von pCMV-TGF- $\beta$ . IL-10 hat einen regulatorischen Einfluss auf Th1-Zellen. So hat IL-10 einen starken suppressiven Effekt auf Th1-Zellen und deren Produktion von Entzündungsmediatoren [Zhou *et al.*, 2005]. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum IL-10 einen stärkeren inhibierenden Effekt auf die Produktion des Th1-Zytokins IFN $\gamma$  hat als TGF- $\beta$ . Die Koapplikation von pFascin-IDO hatte einen stärkeren suppressiven Einfluss auf die IFN- $\gamma$ -Produktion als die Vakzinierung mit pCMV-IDO. Für diesen Effekt scheint es nicht entscheidend zu sein, dass IDO in höherer Konzentration produziert wird. Die Fokussierung der IDO-Produktion auf die DCs, die auch das Antigen exprimieren, scheint hierbei eine Rolle zu spielen und ist in diesem Fall sogar effektiver als die durch den CMV-Promotor ermöglichte IDO-Expression in allen transfizierten Zellen.

Zusammenfassend konnten also teilweise Effekte durch eine protektive Immunisierung mit der Genpistole erzielt werden. Im Fall der Expression von IL-10 besteht die Möglichkeit, dass es zur Induktion regulatorischer T-Zellen kam, die auch nach längerer Zeit noch aktiv waren und somit die Entwicklung einer Atemwegshyperraktivität moderat abmildern konnten. Durch die Verwendung von TGF- $\beta$  konnten auf zellulärer Ebene zwar einige Effekte beobachtet werden, es scheinen allerdings keine Tregs entstanden zu sein, die eine länger anhaltende Aktivität besitzen. Die Expression von IDO scheint auch in diesem Modell keine Tregs zu induzieren. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass die Expression von IDO direkt auf Zellen des Immunsystems wirken könnte. IDO kann auch eine aktivierende Rolle spielen und Th2-vermittelte Immunantworten fördern [Scott *et al.*, 2009]. Dies wurde wie bereits erwähnt in einem Mausmodell der allergischen Atemwegsinfektion gezeigt [Xu *et al.*, 2008]

#### **4.4 Eine Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal hat einen inhibitorischen Effekt auf die Atemwegshyperreaktivität in einem therapeutischen Modell der Typ-I Allergie, der durch Koimmunisierung mit pCMV-IDO noch weiter gesteigert werden kann**

Da in den vorherigen Versuchen gezeigt wurde, dass durch die biolistische Immunisierung mit IDO-kodierenden Vektoren keine Tregs entstehen, die einen langanhaltenden tolerogenen Effekt haben, sollte in einem therapeutischen Modell untersucht werden, ob eine DNA-Immunisierung mit Fascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-IDO einen direkten Effekt auf die Zellen des Immunsystems hat und so zu einem Therapieerfolg im Mausmodell der Typ-I Allergie führt. Dazu wurden Mäuse zuerst durch subkutane Immunisierung mit dem  $\beta$ Gal-Protein sensibilisiert. Anschließend erfolgte die DNA-Immunisierung, gefolgt von einer intranasalen Provokation mit dem Protein. Durch die IDO-Expression vermittelte Effekte auf andere Zellen könnten hierbei eine größere Rolle spielen als bei protektiver Anwendung im Mausmodell. IDO könnte hier direkt auf bereits etablierte antigenspezifische T-Zellen über Mechanismen wie z.B. die Tryptophan-Depletion oder die Kynurenin-Akkumulation wirken. Das Plasmid pFascin-IDO wurde in diesen Versuchen nicht mehr weiter verwendet, da aufgrund der zuvor beschriebenen Ergebnisse nach protektiver Vakzinierung davon ausgegangen werden kann, dass durch eine höhere IDO-Expression, wie sie bei Verwendung des stärkeren CMV-Promotors erreicht wird, eher ein inhibitorischer Effekt auf die Immunantwort erzielt werden kann.

Die Mäuse wurden nach der Sensibilisierung anhand des IgG-Titers im Serum in Gruppen mit im Mittel gleichstarken Serum-Titern eingeteilt. Anschließend erfolgten die DNA-Immunisierung und eine erneute Bestimmung der IgG-Produktion im Serum. Ein Einfluss der DNA-Immunisierung mit Hilfe der Genpistole auf die Produktion von antigenspezifischem IgG1 und IgG2 konnte hier nicht nachgewiesen werden. Auch die Koimmunisierung mit IDO hatte in diesen Versuchen keinen Einfluss auf die antigenspezifische Immunglobulin-Produktion. Die vorherrschende Bildung von IgG1, welches für eine Th2-Antwort charakteristisch ist, konnte durch die DNA-Immunisierung nicht inhibiert werden. Auf die durch die Sensibilisierung mit dem Protein hervorgerufene Th2-Antwort hatte die infolge der DNA-Vakzinierung induzierte Expression von IDO also keinen limitierenden Einfluss.

Die Koapplikation von pCMV-IDO hatte keinen Effekt auf die Rekrutierung der CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen. In der Lunge der mit IDO-kodierenden Plasmiden kovakzinierten



Tieren waren in etwa äquivalente Zahlen an CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ -produzierenden T-Zellen nachweisbar wie in den Tieren, die das Kontroll-Plasmid koappliziert bekamen. In der Milz wurde diese Zahl der CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen bei Verwendung von pFascin- $\beta$ Gal zusammen mit pCMV-IDO sogar noch gesteigert. Hier konnte also kein Effekt durch die IDO-Expression auf die Anzahl zytotoxischer T-Zellen festgestellt werden.

Überraschenderweise wurde ein Effekt der DNA-Immunisierung mit der Genpistole auf die Ausbildung einer Atemwegshyperreaktivität beobachtet. Die biolistische Immunisierung mit dem  $\beta$ Gal-kodierenden Vektor pFascin- $\beta$ Gal führte zu einer moderaten Verminderung der Atemwegsreaktivität verglichen mit den proteinsensibilisierten Kontrollmäusen, die eine deutliche AHR aufwiesen. Diese konnte durch die Verwendung des Kombinations-Vakzins bestehend aus pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IDO noch weiter inhibiert werden.

Die zelluläre Zusammensetzung der bronchoalveolären Lavage lieferte einige Hinweise auf die Wirkung von IDO. So waren in den Lungenspülungen der Tiere, die mit einer Kombination aus pFascin- $\beta$ Gal und pCMV-IDO immunisiert wurden, prozentual weniger Lymphozyten nachweisbar, als in den mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid behandelten Tieren. Des Weiteren befanden sich auch weniger Neutrophile in den Lungen der mit pCMV-IDO vakzinierten Tiere. Die Anzahl der Eosinophilen hingegen wurde durch die IDO-Expression nicht beeinflusst. Eine mögliche Erklärung für die geringere Anzahl an Lymphozyten und Neutrophilen könnte eine durch die Induktion der IDO induzierte T-Zell-Apoptose sein, da der Mangel an Tryptophan Zellen sensibler für Apoptose macht und die Metabolite des Tryptophanabbaus ebenfalls Apoptose induzieren können [Munn *et al.*, 1998, Fallarino *et al.*, 2002]. Einhergehend mit den Ergebnissen der prophylaktischen Studie und dem mangelnden Nachweis regulatorischer T Zellen im Durchflusszytometer und mittels Q-PCR ist es eher unwahrscheinlich, dass es hier zu einer Induktion regulatorischer T-Zellen kam. In Modell der therapeutischen DNA-Vakzinierung konnten jedoch keine Hinweise darauf gefunden werden, ob es zur Induktion regulatorischer T Zellen kommt oder nicht.

Ein weiterer Effekt der IDO-Expression ist eine Inhibition der Produktion von IFN- $\gamma$  durch Zellen in der Lunge. In den Lungenspülungen der Mäuse, die mit pFascin- $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisiert wurden, wurde eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion nachgewiesen verglichen mit den proteinsensibilisierten Kontrollmäusen. Diese wurde durch die IDO-Expression inhibiert. Die IL-5-Konzentration war in den Lungen dieser Tiere ebenfalls moderat vermindert im Vergleich zu den mit  $\beta$ Gal und dem Kontroll-Plasmid immunisierten und den nur mit  $\beta$ Gal sensibilisierten und mit  $\beta$ Gal behandelten Tieren. Die verminderte Produktion von IL-5 und IFN- $\gamma$  könnte darauf zurückzuführen sein, dass in den Lungen der

mit IDO-kovakzinierten Tiere weniger T-Zellen nachweisbar waren. Somit ist auch nur eine geringere Zytokin-Produktion zu erwarten.

Die Wirkung der Produktion von IDO auf T-Zell-Antworten wird bislang noch kontrovers diskutiert. Die meisten Studien zeigten bislang, dass IDO vor allem auf Th1-Zellen wirkt und in der Lage ist Th1-vermittelte Erkrankungen zu inhibieren [Gurtner *et al.*, 2003, Platten *et al.*, 2005 Choi *et al.*, 2006]. Die Wirkung von IDO und der Tryptophan-Metabolite auf Th2-vermittelte Immunantworten ist noch nicht vollständig geklärt [Xu *et al.*, 2008]. Es wurde beschrieben, dass der Abbau von Tryptophan zur Apoptose von Th1-Zellen, aber nicht von Th2-Zellen führt. So kommt es zu einem selektiven Überleben von Th2-Zellen und zur Förderung einer Th2-vermittelten Immunantwort [Fallarino *et al.*, 2002]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Expression von IDO zur verminderten Produktion von Th1 Zytokinen führt und die Synthese von Th2-Zytokinen gefördert wird [Molano *et al.*, 2008]. Hayashi *et al.* [2004] hingegen fanden in einem Modell des experimentellen Asthmas heraus, dass die induzierte Expression von IDO sowohl die Th1- als auch die Th2-vermittelte Entzündung der Lunge inhibiert. Gordon *et al.* [2005] zeigten, dass CD8<sup>+</sup> DC, die IDO exprimieren, die Th2-Zytokin-Produktion *in vitro* inhibieren und nach Transfer *in vivo* die Ausbildung einer Atemwegshypereaktivität reduzieren. IDO scheint auch eine Rolle bei der Immuntherapie mit Allergenen im Mausmodell der Th2-abhängigen allergischen Atemwegsinfektion zu spielen. Sie reduziert die Eosinophilie in den Atemwegen und die Produktion von Th2-Zytokinen. Dieser Effekt wurde in diesem Modell durch die Metabolite des Tryptophan-Abbaus vermittelt und nicht durch den Mangel an Tryptophan an sich [Taher *et al.*, 2008].

Die Resultate der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass der Effekt von IDO direkt über zellvermittelte Mechanismen vermittelt wird und nicht durch die Induktion von Treg, da zum einen keine Treg direkt nachgewiesen werden konnten und zum anderen IDO Effekte in dem therapeutischen Modell, auf zellulärer Ebene und auch auf die Ausbildung einer Atemwegsreaktivität hatte. Der deutlichste Effekt war hierbei auf die Ausbildung einer Th2-vermittelten Atemwegshyperreaktivität zu beobachten, die durch die Expression von IDO vermindert wurde. Die Tatsache, dass IDO im protektiven Modell keinen inhibierenden Effekt hatte lässt darauf schließen, dass keine Treg entstehen, welche die Effekte einer nachgeschaltete Proteinsensibilisierung überkommen können.

#### **4.5 Eine Immunisierung mit pCMV-βGal hat einen inhibitorischen Effekt auf die Atemwegshyperreaktivität in einem therapeutischen Modell der Typ-I Allergie, der durch Koimmunisierung mit pCMV-IDO nicht weiter gesteigert werden kann**

In den ersten Versuchen einer Koimmunisierung mit IDO-kodierenden Vektoren wurde gezeigt, dass es wichtig ist die Expression des Antigens auf DC zu beschränken, um eine Überaktivierung des Immunsystems zu verhindern. Dies sollte in den nächsten Experimenten für das therapeutische Modell der biolistischen Immunisierung mit βGal kodierender Plasmid-DNA in Kombination mit pCMV-IDO bestätigt werden. Hierzu wurde βGal unter Kontrolle des CMV-Promotors verwendet und die gleichen Experimente wie zuvor mit pFascin-βGal beschrieben wurden durchgeführt. Die durch die Proteinsensibilisierung induzierte Th2-Antwort und die damit einhergehende IgG1-Produktion wurden durch eine biolistische DNA-Immunisierung mit pCMV-βGal und einem Kontroll-Plasmid stark gesteigert. Auch IgG2a war leicht erhöht. Eine Behandlung mit dem Kombinations-Vakzin bestehend aus pCMV-βGal und pCMV-IDO führte im Vergleich dazu zu einer geringeren IgG1- und IgG2a-Produktion.

Die Anzahl zytotoxischer T-Zellen in der Lunge war durch die DNA-Immunisierung erhöht. In den Milzen dieser immunisierten Tiere konnte nur eine geringe Anzahl der CD8<sup>+</sup> IFN-γ-produzierenden T-Zellen nachgewiesen werden, die leicht erhöht war verglichen mit den proteinsensibilisierten und mit βGal provozierten Tieren.

Eine DNA-Immunisierung mit pCMV-βGal alleine und in Kombination mit pCMV-IDO führte zu einer Reduktion der Atemwegsreaktivität nach Provokation mit hohen Methacholin-Dosen. Hierbei hatte IDO keinen weiteren inhibitorischen Effekt.

Der prozentuale Anteil an Eosinophilen und Neutrophilen in der Lunge wurde durch die biolistische Vakzinierung nicht beeinflusst. Der Anteil an neutrophilen Granulozyten war allerdings vergleichsweise gering. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die entstandene Atemwegsinflammation eher durch Th2-Zellen vermittelt ist.

In den Überständen der BAL konnte das Th1-Zytokin IFN-γ nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Der Gehalt an IL-5 war in den Lungenspülungen der biolistisch immunisierten Mäuse im Vergleich zu denen der Kontrollmäuse ohne Vakzinierung reduziert.

Die durch die Proteinsensibilisierung induzierte Th2-Antwort konnte also entgegen der zuvor aufgestellten Theorien durch eine DNA-Immunisierung mit pCMV- $\beta$ Gal inhibiert werden. Eine Koapplikation von pCMV-IDO hatte hierbei keinen weiteren Einfluss. Eine DNA-Immunisierung mit dem Antigen scheint also an sich schon einen inhibierenden Effekt zu haben. Dabei scheint es keine Rolle zu spielen, ob die Expression auf Dendritische Zellen beschränkt bleibt oder alle Zellen das Antigen exprimieren.

Es gibt also Grund zu der Annahme, dass eine therapeutische DNA-Immunisierung mit allergenkodierender Plasmid-DNA einen inhibierenden Effekt auf die Ausbildung einer Atemwegsreaktivität hat. Hierbei scheint es keine Rolle zu spielen, ob die Transgenexpression auf DC beschränkt ist oder ob sie in allen transfizierten Zellen stattfinden kann. Eine weitere Reduktion der Atemwegsinfektion durch den Immunregulator IDO kann hingegen nur erreicht werden, wenn die Antigenexpression durch die Verwendung des Fascin-Promotors auf DC beschränkt bleibt. Hierbei könnte es eine Rolle spielen, dass durch die Verwendung des CMV-Promotors wie schon zuvor erwähnt eine stärkere Aktivierung der Immunantwort einhergehend mit einer Überaktivierung induziert wird.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass eine DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit pCMV-TGF- $\beta$  von den getesteten immunregulatorischen Molekülen am wenigsten zur Therapie allergischer Inflammationen geeignet ist. Es wurden bei der Verwendung von TGF- $\beta$  die geringsten inhibierenden Effekte auf die allergenspezifische Immunantwort, vor allem auf die allergeninduzierte Atemwegsreaktivität, nachgewiesen. Des Weiteren konnte im Mausmodell der Typ-I Allergie durch eine prophylaktische DNA-Immunisierung mit pCMV-TGF- $\beta$  keine Treg-Induktion nachgewiesen werden.

IL-10 hingegen hatte sowohl wenn eine DNA-Immunisierung alleine durchgeführt wurde, als auch im protektiven Modell der Atemwegsinfektion einen inhibierenden Effekt auf die Atemwegshyperreaktivität. Hier wurden möglicherweise Tregs induziert, die die durch die nachfolgende Proteinsensibilisierung induzierte Immunantwort inhibieren können. IL-10 scheint also ein potenzieller Kandidat für eine Immuntherapie mit Kombinations-Vakzinen zu sein.

Das gleiche gilt für eine Kovakzinierung mit IDO. Die Immunisierung mit allergenkodierender Plasmid-DNA unter Kontrolle des Fascin-Promotors in Kombination mit

pCMV-IDO inhibierte in einem therapeutischen Modell die allergenvermittelte Atemwegshyperreaktivität.

## **5. Zusammenfassung**

Die Induktion von Toleranz spielt bei der Inhibition allergischer Immunreaktionen eine wichtige Rolle. Hierbei ist die Induktion regulatorischer T Zellen (Treg) von großer Bedeutung. Da zu einer erfolgreichen Behandlung von allergischen Erkrankungen bisher nur wenige Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen wie die spezifische Immuntherapie (SIT), die allerdings nicht immer zum Erfolg führt, ist es wichtig neue Therapieformen zu entwickeln.

In dieser Arbeit wurde daher die biolistische DNA-Immunisierung mit Kombinations-Vakzinen bestehend aus einem allergenkodierenden Plasmid ( $\beta$ Galaktosidase ( $\beta$ Gal)) in Kombination mit einem Plasmid, welches für ein immunmodulatorisches Molekül kodiert (Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) oder Interleukin-10 (IL-10)), durchgeführt und im Mausmodell der allergeninduzierten IgE-vermittelten Atemwegsinflammation auf ihre Wirksamkeit untersucht. Die Expression des Allergens zusammen mit dem immunregulatorischen Molekül in transfizierten Dendritischen Zellen (DCs) sollte zu einer Induktion von Treg führen und somit eine Suppression der Immunantwort bewirken.

In den Versuchen wurde zunächst der Effekt einer Transgenexpression unter der Kontrolle des ubiquitären CMV-Promotors mit dem der Transgenexpression unter der Kontrolle des Fascin-Promotors, der eine Genexpression spezifisch in DCs erlaubt, verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass es wichtig ist die Expression des Antigens mit Hilfe des Fascin-Promotors auf DCs zu beschränken. Einzig in diesem Fall konnte nach der Vakzinierung ein inhibitorischer Effekt auf die Entwicklung einer Atemwegshyperreaktivität durch Expression des Immunmodulator IDO beobachtet werden. Es zeigte sich auch, dass es von Vorteil ist, wenn das immunregulatorische Molekül unter Verwendung des CMV-Promotors in allen transfizierten Zellen exprimiert wird. Dies bewirkt, dass IDO in ausreichenden Konzentrationen vorhanden ist.

Die Expression von  $\beta$ Gal unter der Kontrolle des Fascin-Promotors (pFascin- $\beta$ Gal) in Kombination mit der Expression der Moleküle IL-10, TGF- $\beta$  oder IDO unter Kontrolle des CMV-Promotors (pCMV-IL-10, pCMV-TGF $\beta$ , pCMV-IDO) bewirkte eine Immunsupprimierung, die sich in einer inhibierten Produktion antigenspezifischer Antikörper, einer verminderten Zytokin-Produktion, einer reduzierten Induktion zytotoxischer T-Zellen und in einer Inhibition der allergeninduzierten Atemwegshyperreaktivität zeigte, im Vergleich zu einer Vakzinierung mit pFascin- $\beta$ Gal in Kombination mit einem Kontroll-Plasmid. Bei

nachfolgender Proteinsensibilisierung blieben diese Effekte jedoch nicht bestehen. Einzig durch Vakzinierung mit IL-10-kodierenden Plasmiden konnte eine moderate Verminderung der Atemwegsreaktivität nachgewiesen werden.

In einem therapeutischen Modell der Atemwegsinflammation, in dem die Mäuse vor der DNA-Immunisierung mit dem Protein sensibilisiert wurden, wurde demonstriert, dass im Vergleich zu Mäusen, die nur mit dem Protein sensibilisiert wurden, eine DNA-Immunisierung mit pFascin- $\beta$ Gal aber auch mit pCMV- $\beta$ Gal einen inhibierenden Einfluss auf die Entwicklung einer Atemwegsinflammation hat. Eine weitere Reduktion der Atemwegsreaktivität durch eine kombinierte Vakzinierung mit pCMV-IDO wurde nur erreicht, wenn  $\beta$ Gal unter der Kontrolle des Fascin-Promotors exprimiert wurde, nicht aber unter Kontrolle des CMV-Promotors.

## **6. Abstract**

The induction of tolerance plays an important role in the inhibition of allergic immune responses. In this regard the induction of regulatory T cells (Treg) has great relevance. Currently, only a few therapeutic options to treat allergic diseases exist. The most distinguished one is specific immunotherapy (SIT). Because these therapies are not successful in all cases it is important to develop new strategies for the treatment of allergic diseases.

Therefore I analysed the effect of biolistic DNA-immunization in a mouse model of allergen-induced IgE-mediated airway inflammation using a combination of allergen-encoding plasmids ( $\beta$ Galaktosidase ( $\beta$ Gal)) in combination with an immunomodulatory molecule (Indolamine 2,3-Dioxygenase (IDO), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) or interleukin-10 (IL-10)). The simultaneous expression of the allergen together with the immunomodulatory molecule in transfected dendritic cells (DC) is thought to induce the differentiation of regulatory T cells (Treg) and thereby should lead to the induction of suppression of the immune responses.

Initially, I compared the result of the expression of the transgene under the control of the ubiquitous CMV promoter with the expression of the transgene restricted to DC by the use of the cell-specific fascin promoter. In this respect I worked out that it is important to limit the antigen-expression specifically to DC. Only in this case an inhibitory effect on airway hyperreactivity could be shown after co-immunization of  $\beta$ Gal together with the immunomodulatory molecule IDO.

Furthermore I showed that it is important to express the immunoregulatory molecule under the control of the CMV promoter and not the fascin promoter to ensure that it is expressed by all transfected cells. This provides the generation of the accordant molecule in abundant concentrations.

The expression of  $\beta$ Gal under the control of the fascin promoter (pFascin- $\beta$ Gal) together with the expression of the molecules IL-10, TGF- $\beta$  or IDO under control of the CMV promoter (pCMV-IL-10, pCMV-TGF $\beta$ , pCMV-IDO) causes immunosuppression that is characterized by an inhibition of the antigen-specific antibody production, a diminished cytokine production, a reduced induction of cytotoxic T cells and the inhibition of allergen-induced airway reactivity. However, after subsequent protein sensitization these effects did not persist. Only vaccination with IL-10-encoding plasmids was capable to induce a moderate decline of airway reactivity.

A reduced airway inflammation could be demonstrated after therapeutic vaccination with pFascin- $\beta$ Gal as well as with pCMV- $\beta$ Gal in the mouse model of airway inflammation. A



further inhibition by co-vaccination with pCMV-IDO could only be achieved when  $\beta$ Gal was expressed under the control of the fascin promoter, but not the CMV promoter.

## **D) Literaturverzeichnis**

- Adorini,L.**, Giarratana,N., and Penna,G. 2004. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin. Immunol.* **16**:127-134.
- Agaugue,S.**, Perrin-Cocon,L., Coutant,F., Andre,P., and Lotteau,V. 2006. 1-Methyl-tryptophan can interfere with TLR signaling in dendritic cells independently of IDO activity. *J. Immunol.* **177**:2061-2071.
- Akdis,C.A.**, Blesken,T., Akdis,M., Wuthrich,B., and Blaser,K. 1998. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J. Clin. Invest* **102**:98-106.
- Akdis,C.A.**, and Akdis,M. 2011. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**:18-27.
- Akdis,M.**, Verhagen,J., Taylor,A., Karamloo,F., Karagiannidis,C., Crameri,R., Thunberg,S., Deniz,G., Valenta,R., Fiebig,H. et al 2004. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* **199**:1567-1575.
- Akdis,M.** 2008. T-cell tolerance to inhaled allergens: mechanisms and therapeutic approaches. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **8**:769-777.
- Akkoc,T.**, Akdis,M., and Akdis,C.A. 2011. Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy Asthma Immunol. Res.* **3**:11-20.
- Alvarez,D.**, Harder,G., Fattouh,R., Sun,J., Goncharova,S., Stampfli,M.R., Coyle,A.J., Bramson,J.L., and Jordana,M. 2005. Cutaneous antigen priming via gene gun leads to skin-selective Th2 immune-inflammatory responses. *J. Immunol.* **174**:1664-1674.
- Babcock,T.A.**, and Carlin,J.M. 2000. Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine* **12**:588-594.
- Banchereau,J.**, and Steinman,R.M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-252.
- Banchereau,J.**, Briere,F., Caux,C., Davoust,J., Lebecque,S., Liu,Y.J., Pulendran,B., and Palucka,K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:767-811.
- Baniyash,M.**, and Eshhar,Z. 1984. Inhibition of IgE binding to mast cells and basophils by monoclonal antibodies to murine IgE. *Eur. J. Immunol.* **14**:799-807.
- Barry,M.E.**, Pinto-Gonzalez,D., Orson,F.M., McKenzie,G.J., Petry,G.R., and Barry,M.A. 1999. Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection. *Hum. Gene Ther.* **10**:2461-2480.

- Belladonna,M.L.**, Grohmann,U., Guidetti,P., Volpi,C., Bianchi,R., Fioretti,M.C., Schwarcz,R., Fallarino,F., and Puccetti,P. 2006. Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. *J. Immunol.* **177**:130-137.
- Belladonna,M.L.**, Puccetti,P., Orabona,C., Fallarino,F., Vacca,C., Volpi,C., Gizzi,S., Pallotta,M.T., Fioretti,M.C., and Grohmann,U. 2007. Immunosuppression via tryptophan catabolism: the role of kynurenine pathway enzymes. *Transplantation* **84**:S17-S20.
- Belladonna,M.L.**, Volpi,C., Bianchi,R., Vacca,C., Orabona,C., Pallotta,M.T., Boon,L., Gizzi,S., Fioretti,M.C., Grohmann,U. et al 2008. Cutting edge: Autocrine TGF-beta sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells. *J. Immunol.* **181**:5194-5198.
- Bellinghausen,I.**, Metz,G., Enk,A.H., Christmann,S., Knop,J., and Saloga,J. 1997. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur. J. Immunol.* **27**:1131-1139.
- Bharadwaj,A.S.**, Bewtra,A.K., and Agrawal,D.K. 2007. Dendritic cells in allergic airway inflammation. *Can. J. Physiol Pharmacol.* **85**:686-699.
- Broide,D.H.** 2001. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**:S65-S71.
- Buckner,J.H.**, and Ziegler,S.F. 2004. Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. *Arthritis Res. Ther.* **6**:215-222.
- Busse,W.**, and Neaville,W. 2001. Anti-immunoglobulin E for the treatment of allergic disease. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **1**:105-108.
- Chatila,T.A.** 2005. Role of regulatory T cells in human diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **116**:949-959.
- Chen,D.**, Maa,Y.F., and Haynes,J.R. 2002. Needle-free epidermal powder immunization. *Expert. Rev. Vaccines.* **1**:265-276.
- Chen,L.Z.**, Hochwald,G.M., Huang,C., Dakin,G., Tao,H., Cheng,C., Simmons,W.J., Dranoff,G., and Thorbecke,G.J. 1998. Gene therapy in allergic encephalomyelitis using myelin basic protein-specific T cells engineered to express latent transforming growth factor-beta1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:12516-12521.
- Chen,W.F.**, and Zlotnik,A. 1991. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J. Immunol.* **147**:528-534.
- Chen,Y.**, Kuchroo,V.K., Inobe,J., Hafler,D.A., and Weiner,H.L. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**:1237-1240.
- Cherwinski,H.M.**, Schumacher,J.H., Brown,K.D., and Mosmann,T.R. 1987. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* **166**:1229-1244.

- Choi,B.K.**, Asai,T., Vinay,D.S., Kim,Y.H., and Kwon,B.S. 2006. 4-1BB-mediated amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis is caused by indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanisms. *Cytokine* **34**:233-242.
- Chung,D.J.**, Rossi,M., Romano,E., Ghith,J., Yuan,J., Munn,D.H., and Young,J.W. 2009. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. *Blood* **114**:555-563.
- Cohn,L.**, Tepper,J.S., and Bottomly,K. 1998. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *J. Immunol.* **161**:3813-3816.
- Coombs** and Gell. 1968. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. Clinical aspects of immunology. Blackwell, Oxford, S. 587-592
- Condon,C.**, Watkins,S.C., Celluzzi,C.M., Thompson,K., and Falo,L.D., Jr. 1996. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat. Med.* **2**:1122-1128.
- Cookson,W.O.**, and Moffatt,M.F. 1997. Asthma: an epidemic in the absence of infection? *Science* **275**:41-42.
- Cottrez,F.**, and Groux,H. 2001. Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10. *J. Immunol.* **167**:773-778.
- Creticos,P.S.**, Van Metre,T.E., Mardiney,M.R., Rosenberg,G.L., Norman,P.S., and Adkinson,N.F., Jr. 1984. Dose response of IgE and IgG antibodies during ragweed immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **73**:94-104.
- Cua,D.J.**, Groux,H., Hinton,D.R., Stohlman,S.A., and Coffman,R.L. 1999. Transgenic interleukin 10 prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **189**:1005-1010.
- Das,L.**, and Levine,A.D. 2008. TGF-beta inhibits IL-2 production and promotes cell cycle arrest in TCR-activated effector/memory T cells in the presence of sustained TCR signal transduction. *J. Immunol.* **180**:1490-1498.
- de Waal,M.R.**, Abrams,J., Bennett,B., Figdor,C.G., and de Vries,J.E. 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* **174**:1209-1220.
- De,S.T.**, Van,M.M., De,B.G., Urbain,J., Leo,O., and Moser,M. 1997. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur. J. Immunol.* **27**:1229-1235.
- Donnelly,J.J.**, Ulmer,J.B., Shiver,J.W., and Liu,M.A. 1997. DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:617-648.
- Dullaers,M.**, and Thielemans,K. 2006. From pathogen to medicine: HIV-1-derived lentiviral vectors as vehicles for dendritic cell based cancer immunotherapy. *J. Gene Med.* **8**:3-17.
- Durham,S.R.**, Walker,S.M., Varga,E.M., Jacobson,M.R., O'Brien,F., Noble,W., Till,S.J., Hamid,Q.A., and Nouri-Aria,K.T. 1999. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N. Engl. J. Med.* **341**:468-475.

- Durham,S.R.** 1999. Allergic inflammation: cellular aspects. *Allergy* **54 Suppl 56**:18-20.
- Enk,A.H.** 2005. Dendritic cells in tolerance induction. *Immunol. Lett.* **99**:8-11.
- Fallarino,F.**, Grohmann,U., Vacca,C., Bianchi,R., Orabona,C., Spreca,A., Fioretti,M.C., and Puccetti,P. 2002. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death. Differ.* **9**:1069-1077.
- Fallarino,F.**, Vacca,C., Orabona,C., Belladonna,M.L., Bianchi,R., Marshall,B., Keskin,D.B., Mellor,A.L., Fioretti,M.C., Grohmann,U. et al 2002. Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells. *Int. Immunol.* **14**:65-68.
- Fallarino,F.**, Grohmann,U., Vacca,C., Orabona,C., Spreca,A., Fioretti,M.C., and Puccetti,P. 2003. T cell apoptosis by kynurenines. *Adv. Exp. Med. Biol.* **527**:183-190.
- Fallarino,F.**, Grohmann,U., Hwang,K.W., Orabona,C., Vacca,C., Bianchi,R., Belladonna,M.L., Fioretti,M.C., Alegre,M.L., and Puccetti,P. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**:1206-1212.
- Fallarino,F.**, Grohmann,U., You,S., McGrath,B.C., Cavener,D.R., Vacca,C., Orabona,C., Bianchi,R., Belladonna,M.L., Volpi,C. et al 2006. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol.* **176**:6752-6761.
- Filippi,C.M.**, Juedes,A.E., Oldham,J.E., Ling,E., Togher,L., Peng,Y., Flavell,R.A., and von Herrath,M.G. 2008. Transforming growth factor-beta suppresses the activation of CD8+ T-cells when naive but promotes their survival and function once antigen experienced: a two-faced impact on autoimmunity. *Diabetes* **57**:2684-2692.
- Fiorentino,D.F.**, Zlotnik,A., Vieira,P., Mosmann,T.R., Howard,M., Moore,K.W., and O'Garra,A. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* **146**:3444-3451.
- Frew,A.J.** 2003. 25. Immunotherapy of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**:S712-S719.
- Frumento,G.**, Rotondo,R., Tonetti,M., Damonte,G., Benatti,U., and Ferrara,G.B. 2002. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.* **196**:459-468.
- Fu,C.L.**, Chuang,Y.H., Chau,L.Y., and Chiang,B.L. 2006. Effects of adenovirus-expressing IL-10 in alleviating airway inflammation in asthma. *J. Gene Med.* **8**:1393-1399.
- Fu,C.L.**, Ye,Y.L., Lee,Y.L., and Chiang,B.L. 2006. Effects of overexpression of IL-10, IL-12, TGF-beta and IL-4 on allergen induced change in bronchial responsiveness. *Respir. Res.* **7**:72.
- Fynan,E.F.**, Webster,R.G., Fuller,D.H., Haynes,J.R., Santoro,J.C., and Robinson,H.L. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:11478-11482.

- Geha,R.S.**, Jabara,H.H., and Brodeur,S.R. 2003. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:721-732.
- Go,N.F.**, Castle,B.E., Barrett,R., Kastelein,R., Dang,W., Mosmann,T.R., Moore,K.W., and Howard,M. 1990. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J. Exp. Med.* **172**:1625-1631.
- Gordon,J.R.**, Li,F., Nayyar,A., Xiang,J., and Zhang,X. 2005. CD8 alpha+, but not CD8 alpha-, dendritic cells tolerize Th2 responses via contact-dependent and -independent mechanisms, and reverse airway hyperresponsiveness, Th2, and eosinophil responses in a mouse model of asthma. *J. Immunol.* **175**:1516-1522.
- Gorelik,L.**, Constant,S., and Flavell,R.A. 2002. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J. Exp. Med.* **195**:1499-1505.
- Gregori,S.**, Tomasoni,D., Pacciani,V., Scirpoli,M., Battaglia,M., Magnani,C.F., Hauben,E., and Roncarolo,M.G. 2010. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* **116**:935-944.
- Grohmann,U.**, and Puccetti,P. 2002. The immunosuppressive activity of proinflammatory cytokines in experimental models: potential for therapeutic intervention in autoimmunity. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* **1**:77-87.
- Grohmann,U.**, Orabona,C., Fallarino,F., Vacca,C., Calcinaro,F., Falorni,A., Candeloro,P., Belladonna,M.L., Bianchi,R., Fioretti,M.C. et al 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* **3**:1097-1101.
- Grohmann,U.**, Fallarino,F., and Puccetti,P. 2003. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* **24**:242-248.
- Groux,H.**, O'Garra,A., Bigler,M., Rouleau,M., Antonenko,S., de Vries,J.E., and Roncarolo,M.G. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**:737-742.
- Groux,H.**, Cottrez,F., Rouleau,M., Mauze,S., Antonenko,S., Hurst,S., McNeil,T., Bigler,M., Roncarolo,M.G., and Coffman,R.L. 1999. A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. *J. Immunol.* **162**:1723-1729.
- Groux,H.**, and Cottrez,F. 2003. The complex role of interleukin-10 in autoimmunity. *J. Autoimmun.* **20**:281-285.
- Gurtner,G.J.**, Newberry,R.D., Schloemann,S.R., McDonald,K.G., and Stenson,W.F. 2003. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology* **125**:1762-1773.
- Hansen,G.**, Berry,G., DeKruyff,R.H., and Umetsu,D.T. 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J. Clin. Invest* **103**:175-183.

- Hayashi,T.**, Beck,L., Rossetto,C., Gong,X., Takikawa,O., Takabayashi,K., Broide,D.H., Carson,D.A., and Raz,E. 2004. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest* **114**:270-279.
- Hill,M.**, Tanguy-Royer,S., Royer,P., Chauveau,C., Asghar,K., Tesson,L., Lavainne,F., Remy,S., Brion,R., Hubert,F.X. et al 2007. IDO expands human CD4+CD25high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **37**:3054-3062.
- Hwu,P.**, Du,M.X., Lapointe,R., Do,M., Taylor,M.W., and Young,H.A. 2000. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J. Immunol.* **164**:3596-3599.
- Inobe,J.**, Slavin,A.J., Komagata,Y., Chen,Y., Liu,L., and Weiner,H.L. 1998. IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **28**:2780-2790.
- Iwasaki,A.**, and Medzhitov,R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**:987-995.
- Jaffe,R.**, DeVaughn,D., and Langhoff,E. 1998. Fascin and the differential diagnosis of childhood histiocytic lesions. *Pediatr. Dev. Pathol.* **1**:216-221.
- Jang,E.**, Cho,W.S., Cho,M.L., Park,H.J., Oh,H.J., Kang,S.M., Paik,D.J., and Youn,J. 2011. Foxp3+ regulatory T cells control humoral autoimmunity by suppressing the development of long-lived plasma cells. *J. Immunol.* **186**:1546-1553.
- Johnson,C.C.**, Ownby,D.R., Zoratti,E.M., Alford,S.H., Williams,L.K., and Joseph,C.L. 2002. Environmental epidemiology of pediatric asthma and allergy. *Epidemiol. Rev.* **24**:154-175.
- Jonuleit,H.**, Schmitt,E., Steinbrink,K., and Enk,A.H. 2001. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* **22**:394-400.
- Jonuleit,H.**, and Schmitt,E. 2003. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol.* **171**:6323-6327.
- Josien,R., Douillard,P., Guillot,C., Muschen,M., Anegon,I., Chetritt,J., Menoret,S., Vignes,C., Souillou,J.P., and Cuturi,M.C. 1998. A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J. Clin. Invest* **102**:1920-1926.
- Jutel,M.**, Akdis,M., Budak,F., Aebischer-Casaulta,C., Wrzyszczy,M., Blaser,K., and Akdis,C.A. 2003. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* **33**:1205-1214.
- Jutel,M.**, and Akdis,C.A. 2011. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* **66**:725-732.
- Jutel,M.**, and Akdis,C.A. 2011. T-cell subset regulation in atopy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **11**:139-145.

- Kalinski,P.**, Hilkens,C.M., Wierenga,E.A., and Kapsenberg,M.L. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* **20**:561-567.
- Kamimura,S.**, Eguchi,K., Yonezawa,M., and Sekiba,K. 1991. Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. *Acta Med. Okayama* **45**:135-139.
- Kamimura,S.**, Eguchi,K., and Sekiba,K. 1991. Tryptophan and its metabolite concentrations in human plasma and breast milk during the perinatal period. *Acta Med. Okayama* **45**:101-106.
- Kay,A.B.** 2000. Overview of 'allergy and allergic diseases: with a view to the future'. *Br. Med. Bull.* **56**:843-864.
- Keane-Myers,A.**, Gause,W.C., Linsley,P.S., Chen,S.J., and Wills-Karp,M. 1997. B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways are required for the development of T helper cell 2-mediated allergic airway responses to inhaled antigens. *J. Immunol.* **158**:2042-2049.
- Kendall,M.**, Mitchell,T.J., Costigan,G., Armitage,M., Lenzo,J.C., Thomas,J.A., von,G.C., Zosky,G.R., Turner,D.J., Stumbles,P.A. et al 2006. Downregulation of IgE antibody and allergic responses in the lung by epidermal biolistic microparticle delivery. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**:275-282.
- King,N.J.**, and Thomas,S.R. 2007. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**:2167-2172.
- Klunker,S.**, Chong,M.M., Mantel,P.Y., Palomares,O., Bassin,C., Ziegler,M., Ruckert,B., Meiler,F., Akdis,M., Littman,D.R. et al 2009. Transcription factors RUNX1 and RUNX3 in the induction and suppressive function of Foxp3+ inducible regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**:2701-2715.
- Kool,M.**, and Lambrecht,B.N. 2007. Dendritic cells in asthma and COPD: opportunities for drug development. *Curr. Opin. Immunol.* **19**:701-710.
- Kwidzinski,E.**, Bunse,J., Aktas,O., Richter,D., Mutlu,L., Zipp,F., Nitsch,R., and Bechmann,I. 2005. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. *FASEB J.* **19**:1347-1349.
- Lambrecht,B.N.** 2001. The dendritic cell in allergic airway diseases: a new player to the game. *Clin. Exp. Allergy* **31**:206-218.
- Lewis,D.B.** 2002. Allergy immunotherapy and inhibition of Th2 immune responses: a sufficient strategy? *Curr. Opin. Immunol.* **14**:644-651.
- Lewkowicz,P.**, Lewkowicz,N., Sasiak,A., and Tchorzewski,H. 2006. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J. Immunol.* **177**:7155-7163.



- Li,M.**, Zhang,X., Zheng,X., Lian,D., Zhang,Z.X., Sun,H., Suzuki,M., Vladau,C., Huang,X., Xia,X. et al 2008. Tolerogenic dendritic cells transferring hyporesponsiveness and synergizing T regulatory cells in transplant tolerance. *Int. Immunol.* **20**:285-293.
- Lingnau,K.**, Hoehn,P., Kerdine,S., Koelsch,S., Neudoerfl,C., Palm,N., Ruede,E., and Schmitt,E. 1998. IL-4 in combination with TGF-beta favors an alternative pathway of Th1 development independent of IL-12. *J. Immunol.* **161**:4709-4718.
- Liu,H.**, Liu,L., Fletcher,B.S., and Visner,G.A. 2006. Novel action of indoleamine 2,3-dioxygenase attenuating acute lung allograft injury. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **173**:566-572.
- Liu,H.**, Liu,L., Liu,K., Bizargity,P., Hancock,W.W., and Visner,G.A. 2009. Reduced cytotoxic function of effector CD8+ T cells is responsible for indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent immune suppression. *J. Immunol.* **183**:1022-1031.
- Ludwig-Portugall,I.**, Montermann,E., Kremer,A., Reske-Kunz,A.B., and Sudowe,S. 2004. Prevention of long-term IgE antibody production by gene gun-mediated DNA vaccination. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**:951-957.
- Maecker,H.T.**, Umetsu,D.T., DeKruyff,R.H., and Levy,S. 1997. DNA vaccination with cytokine fusion constructs biases the immune response to ovalbumin. *Vaccine* **15**:1687-1696.
- Maecker,H.T.**, Hansen,G., Walter,D.M., DeKruyff,R.H., Levy,S., and Umetsu,D.T. 2001. Vaccination with allergen-IL-18 fusion DNA protects against, and reverses established, airway hyperreactivity in a murine asthma model. *J. Immunol.* **166**:959-965.
- Maizels,R.M.**, and Yazdanbakhsh,M. 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:733-744.
- Maurer,D.**, Fiebiger,E., Reininger,B., Wolff-Winiski,B., Jouvin,M.H., Kilgus,O., Kinet,J.P., and Stingl,G. 1994. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals. *J. Exp. Med.* **179**:745-750.
- Mellor,A.L.**, and Munn,D.H. 2001. Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal anti-fetal immune responses. *J. Reprod. Immunol.* **52**:5-13.
- Mellor,A.L.**, and Munn,D.H. 2001. Extinguishing maternal immune responses during pregnancy: implications for immunosuppression. *Semin. Immunol.* **13**:213-218.
- Mellor,A.L.**, and Munn,D.H. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:762-774.
- Mellor,A.L.**, Chandler,P., Baban,B., Hansen,A.M., Marshall,B., Pihkala,J., Waldmann,H., Cobbold,S., Adams,E., and Munn,D.H. 2004. Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int. Immunol.* **16**:1391-1401.

- Miwa,N.**, Hayakawa,S., Miyazaki,S., Myojo,S., Sasaki,Y., Sakai,M., Takikawa,O., and Saito,S. 2005. IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion. *Mol. Hum. Reprod.* **11**:865-870.
- Molano,A.**, Illarionov,P.A., Besra,G.S., Putterman,C., and Porcelli,S.A. 2008. Modulation of invariant natural killer T cell cytokine responses by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunol. Lett.* **117**:81-90.
- Morjaria,J.B.**, Gnanakumaran,G., and Babu,K.S. 2007. Anti-IgE in allergic asthma and rhinitis: an update. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **7**:1739-1747.
- Muller,G.**, Muller,A., Tuting,T., Steinbrink,K., Saloga,J., Szalma,C., Knop,J., and Enk,A.H. 2002. Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naive and sensitized T cells in vivo. *J. Invest Dermatol.* **119**:836-841.
- Munn,D.H.**, Zhou,M., Attwood,J.T., Bondarev,I., Conway,S.J., Marshall,B., Brown,C., and Mellor,A.L. 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* **281**:1191-1193.
- Munn,D.H.** 2002. Tolerogenic antigen-presenting cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **961**:343-345.
- Munn,D.H.**, Sharma,M.D., Lee,J.R., Jhaver,K.G., Johnson,T.S., Keskin,D.B., Marshall,B., Chandler,P., Antonia,S.J., Burgess,R. et al 2002. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* **297**:1867-1870.
- Munn,D.H.**, Sharma,M.D., and Mellor,A.L. 2004. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J. Immunol.* **172**:4100-4110.
- Munn,D.H.**, and Mellor,A.L. 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest* **117**:1147-1154.
- Nir,Y.**, Paz,A., Sabo,E., and Potasman,I. 2003. Fear of injections in young adults: prevalence and associations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **68**:341-344.
- Novak,N.**, and Bieber,T. 2008. 2. Dendritic cells as regulators of immunity and tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**:S370-S374.
- Orabona,C.**, Tomasello,E., Fallarino,F., Bianchi,R., Volpi,C., Bellocchio,S., Romani,L., Fioretti,M.C., Vivier,E., Puccetti,P. et al 2005. Enhanced tryptophan catabolism in the absence of the molecular adapter DAP12. *Eur. J. Immunol.* **35**:3111-3118.
- Orabona,C.**, Puccetti,P., Vacca,C., Biccato,S., Luchini,A., Fallarino,F., Bianchi,R., Velardi,E., Perruccio,K., Velardi,A. et al 2006. Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells. *Blood* **107**:2846-2854.
- Palomares,O.**, Yaman,G., Azkur,A.K., Akkoc,T., Akdis,M., and Akdis,C.A. 2010. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur. J. Immunol.* **40**:1232-1240.

- Pankhurst,T.**, Nash,G., Williams,J., Colman,R., Hussain,A., and Savage,C. 2011. Immunoglobulin subclass determines ability of immunoglobulin (Ig)G to capture and activate neutrophils presented as normal human IgG or disease-associated anti-neutrophil cytoplasm antibody (ANCA)-IgG. *Clin. Exp. Immunol.* **164**:218-226.
- Pertmer,T.M.**, Eisenbraun,M.D., McCabe,D., Prayaga,S.K., Fuller,D.H., and Haynes,J.R. 1995. Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine* **13**:1427-1430.
- Pfeiffer,C.**, Stein,J., Southwood,S., Ketelaar,H., Sette,A., and Bottomly,K. 1995. Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* **181**:1569-1574.
- Piccirillo,C.A.**, Chang,Y., and Prud'homme,G.J. 1998. TGF-beta1 somatic gene therapy prevents autoimmune disease in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* **161**:3950-3956.
- Platten,M.**, Ho,P.P., Youssef,S., Fontoura,P., Garren,H., Hur,E.M., Gupta,R., Lee,L.Y., Kidd,B.A., Robinson,W.H. et al 2005. Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. *Science* **310**:850-855.
- Porgador,A.**, Irvine,K.R., Iwasaki,A., Barber,B.H., Restifo,N.P., and Germain,R.N. 1998. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J. Exp. Med.* **188**:1075-1082.
- Puccetti,P.**, and Grohmann,U. 2007. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:817-823.
- Richards,H.**, Williams,A., Jones,E., Hindley,J., Godkin,A., Simon,A.K., and Gallimore,A. 2010. Novel role of regulatory T cells in limiting early neutrophil responses in skin. *Immunology* **131**:583-592.
- Robinson,D.S.**, Larche,M., and Durham,S.R. 2004. Tregs and allergic disease. *J. Clin. Invest* **114**:1389-1397.
- Rock,K.L.**, and Shen,L. 2005. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol. Rev.* **207**:166-183.
- Rosenberg,H.F.**, Phipps,S., and Foster,P.S. 2007. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**:1303-1310.
- Ross,R.**, Ross,X.L., Schwing,J., Langin,T., and Reske-Kunz,A.B. 1998. The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.* **160**:3776-3782.
- Ross,R.**, Jonuleit,H., Bros,M., Ross,X.L., Yamashiro,S., Matsumura,F., Enk,A.H., Knop,J., and Reske-Kunz,A.B. 2000. Expression of the actin-bundling protein fascin in cultured human dendritic cells correlates with dendritic morphology and cell differentiation. *J. Invest Dermatol.* **115**:658-663.

- Ross,R.**, Sudowe,S., Beisner,J., Ross,X.L., Ludwig-Portugall,I., Steitz,J., Tuting,T., Knop,J., and Reske-Kunz,A.B. 2003. Transcriptional targeting of dendritic cells for gene therapy using the promoter of the cytoskeletal protein fascin. *Gene Ther.* **10**:1035-1040.
- Sabat,R.**, Grutz,G., Warszawska,K., Kirsch,S., Witte,E., Wolk,K., and Geginat,J. 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**:331-344.
- Sakai,K.**, Yokoyama,A., Kohno,N., and Hiwada,K. 1999. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma. *Clin. Exp. Immunol.* **118**:9-15.
- Sato,K.**, Yamashita,N., Baba,M., and Matsuyama,T. 2003. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood* **101**:3581-3589.
- Sato,K.**, and Fujita,S. 2007. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol. Int.* **56**:183-191.
- Scheiblhofer,S.**, Stoecklinger,A., Gruber,C., Hauser-Kronberger,C., Alinger,B., Hammerl,P., Thalhamer,J., and Weiss,R. 2007. Gene gun immunization with clinically relevant allergens aggravates allergen induced pathology and is contraindicated for allergen immunotherapy. *Mol. Immunol.* **44**:1879-1887.
- Scott,G.N.**, DuHadaway,J., Pigott,E., Ridge,N., Prendergast,G.C., Muller,A.J., and Mandik-Nayak,L. 2009. The immunoregulatory enzyme IDO paradoxically drives B cell-mediated autoimmunity. *J. Immunol.* **182**:7509-7517.
- Secrist,H.**, Chelen,C.J., Wen,Y., Marshall,J.D., and Umetsu,D.T. 1993. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J. Exp. Med.* **178**:2123-2130.
- Seder,R.A.**, Marth,T., Sieve,M.C., Strober,W., Letterio,J.J., Roberts,A.B., and Kelsall,B. 1998. Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. *J. Immunol.* **160**:5719-5728.
- Smits,H.H.**, de Jong,E.C., Wierenga,E.A., and Kapsenberg,M.L. 2005. Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* **26**:123-129.
- Spitalny,G.L.**, and Havell,E.A. 1984. Monoclonal antibody to murine gamma interferon inhibits lymphokine-induced antiviral and macrophage tumoricidal activities. *J. Exp. Med.* **159**:1560-1565.
- Steinbrink,K.**, Wolfl,M., Jonuleit,H., Knop,J., and Enk,A.H. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* **159**:4772-4780.
- Stone,T.W.**, and Darlington,L.G. 2002. Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**:609-620.
- Strachan,D.P.** 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* **299**:1259-1260.

- Strobl,H.**, and Knapp,W. 1999. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes. Infect.* **1**:1283-1290.
- Sudowe,S.**, Ludwig-Portugall,I., Montermann,E., Ross,R., and Reske-Kunz,A.B. 2003. Transcriptional targeting of dendritic cells in gene gun-mediated DNA immunization favors the induction of type 1 immune responses. *Mol. Ther.* **8**:567-575.
- Sudowe,S.**, Ludwig-Portugall,I., Montermann,E., Ross,R., and Reske-Kunz,A.B. 2006. Prophylactic and therapeutic intervention in IgE responses by biolistic DNA vaccination primarily targeting dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**:196-203.
- Sudowe,S.**, Dominitzki,S., Montermann,E., Bros,M., Grabbe,S., and Reske-Kunz,A.B. 2009. Uptake and presentation of exogenous antigen and presentation of endogenously produced antigen by skin dendritic cells represent equivalent pathways for the priming of cellular immune responses following biolistic DNA immunization. *Immunology* **128**:e193-e205.
- Taher,Y.A.**, Piavaux,B.J., Gras,R., van Esch,B.C., Hofman,G.A., Bloksma,N., Henricks,P.A., and Van Oosterhout,A.J. 2008. Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent tryptophan metabolites contribute to tolerance induction during allergen immunotherapy in a mouse model. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**:983-991.
- Takaoka,A.**, Tanaka,Y., Tsuji,T., Jinushi,T., Hoshino,A., Asakura,Y., Mita,Y., Watanabe,K., Nakaike,S., Togashi,Y. et al 2001. A critical role for mouse CXC chemokine(s) in pulmonary neutrophilia during Th type 1-dependent airway inflammation. *J. Immunol.* **167**:2349-2353.
- Tang,D.C.**, DeVit,M., and Johnston,S.A. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356**:152-154.
- Taylor,M.W.**, and Feng,G.S. 1991. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.* **5**:2516-2522.
- Terness,P.**, Bauer,T.M., Rose,L., Dufter,C., Watzlik,A., Simon,H., and Opelz,G. 2002. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* **196**:447-457.
- Thompson-Snipes,L.**, Dhar,V., Bond,M.W., Mosmann,T.R., Moore,K.W., and Rennick,D.M. 1991. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J. Exp. Med.* **173**:507-510.
- Till,S.J.**, Francis,J.N., Nouri-Aria,K., and Durham,S.R. 2004. Mechanisms of immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**:1025-1034.
- Toda,M.**, Sato,H., Takebe,Y., Taniguchi,Y., Saito,S., Inouye,S., Takemori,T., and Sakaguchi,M. 2000. Inhibition of immunoglobulin E response to Japanese cedar pollen allergen (Cry j 1) in mice by DNA immunization: different outcomes dependent on the plasmid DNA inoculation method. *Immunology* **99**:179-186.
- van der Marel,A.P.**, Samsom,J.N., Greuter,M., van Berkel,L.A., O'Toole,T., Kraal,G., and Mebius,R.E. 2007. Blockade of IDO inhibits nasal tolerance induction. *J. Immunol.* **179**:894-900.

- Van Oosterhout,A.J.**, Van,E.B., Hofman,G., Hofstra,C.L., Van,A., I, Nijkamp,F.P., Kapsenberg,M.L., Savelkoul,H.F., and Weller,F.R. 1998. Allergen immunotherapy inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness associated with decreased IL-4 production by lymphocytes in a murine model of allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**:622-628.
- van Rijt,L.S.**, and Lambrecht,B.N. 2001. Role of dendritic cells and Th2 lymphocytes in asthma: lessons from eosinophilic airway inflammation in the mouse. *Microsc. Res. Tech.* **53**:256-272.
- Villadangos,J.A.**, and Schnorrer,P. 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:543-555.
- von,Garnier.C.**, and Nicod,L.P. 2009. Immunology taught by lung dendritic cells. *Swiss. Med. Wkly.* **139**:186-192.
- Wang,L.F.**, Lin,J.Y., Hsieh,K.H., and Lin,R.H. 1996. Epicutaneous exposure of protein antigen induces a predominant Th2-like response with high IgE production in mice. *J. Immunol.* **156**:4077-4082.
- Workman,C.J.**, Szymczak-Workman,A.L., Collison,L.W., Pillai,M.R., and Vignali,D.A. 2009. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol. Life Sci.* **66**:2603-2622.
- Wu,L.**, and Dakic,A. 2004. Development of dendritic cell system. *Cell Mol. Immunol.* **1**:112-118.
- Xu,H.**, Oriss,T.B., Fei,M., Henry,A.C., Melgert,B.N., Chen,L., Mellor,A.L., Munn,D.H., Irvin,C.G., Ray,P. et al 2008. Indoleamine 2,3-dioxygenase in lung dendritic cells promotes Th2 responses and allergic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**:6690-6695.
- Xu,H.**, Zhang,G.X., Ciric,B., and Rostami,A. 2008. IDO: a double-edged sword for T(H)1/T(H)2 regulation. *Immunol. Lett.* **121**:1-6.
- Yan,Y.**, Zhang,G.X., Gran,B., Fallarino,F., Yu,S., Li,H., Cullimore,M.L., Rostami,A., and Xu,H. 2010. IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **185**:5953-5961.
- Yazdanbakhsh,M.**, van den Biggelaar,A., and Maizels,R.M. 2001. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol.* **22**:372-377.
- Zhou,X.**, Schmidtke,P., Zepp,F., and Meyer,C.U. 2005. Boosting interleukin-10 production: therapeutic effects and mechanisms. *Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* **5**:465-475.
- Zindler,E.**, Gehrke,N., Luft,C., Reuter,S., Taube,C., Finotto,S., Reske-Kunz,A.B., and Sudowe,S. 2008. Divergent effects of biolistic gene transfer in a mouse model of allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **38**:38-46.

## **E) Abkürzungsverzeichnis**

|         |                                                            |
|---------|------------------------------------------------------------|
| % (v/v) | Volumen-Prozent                                            |
| % (w/v) | Gewichtsprozent                                            |
| µg      | Mikrogramm                                                 |
| µl      | Mikroliter                                                 |
| µM      | Mikromolar                                                 |
| µm      | Mikrometer                                                 |
| Abb.    | Abbildung                                                  |
| AHR     | Atemwegshyperreaktivität                                   |
| APC     | antigenpräsentierende Zelle („antigen presenting cell“)    |
| AR      | Atemwegsreaktivität                                        |
| BAL     | Bronchioalveoläre Lavage                                   |
| BALF    | BAL-Flüssigkeit                                            |
| Bin 1   | „bridging integrator 1“                                    |
| Bp      | Basenpaare                                                 |
| BSA     | Rinderserumalbumin („Bovine Serum Albumin“)                |
| C       | Celsius                                                    |
| CD      | “cluster of differentiation”                               |
| cDC     | konventionelle Dendritische Zelle                          |
| cDNA    | komplementäre DNA („complementary DNA“)                    |
| cm      | Zentimeter                                                 |
| CMV     | Cytomegalovirus                                            |
| CTL     | zytotoxische T-Lymphozyten                                 |
| CTLA-4  | „cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4“              |
| DAP 12  | “DNAX-activating protein of molecular mass 12 kilodaltons” |
| DC      | Dendritische Zelle („dendritic cell“)                      |
| DEPC    | Diethylpyrocarbonat                                        |
| dest.   | destilliert                                                |
| DMEM    | „Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium“                       |
| DMF     | Dimethylformamid                                           |
| DMSO    | Dimethylsulfoxid                                           |
| DNA     | Desoxyribonukleinsäure                                     |

|                               |                                                                             |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| dNTP                          | Desoxyribonukleosidtriphosphat                                              |
| DPBS                          | „Dulbecco´s Phosphat Buffered Saline“                                       |
| DTH                           | „delayed type hypersensitivity“                                             |
| DTT                           | Dithiothreitol                                                              |
| E                             | Extinktion                                                                  |
| EAE                           | experimentelle autoimmune Enzephalitis                                      |
| EAU                           | experimentelle autoimmune Uveitis                                           |
| EDTA                          | Ethylendiamintetraessigsäure                                                |
| EGFP                          | „enhanced green fluorescent protein“                                        |
| EGTA                          | Ethylenglykolteraessigsäure                                                 |
| ELISA                         | „enzyme linked immunosorbent assay“                                         |
| EMEM                          | „Eagle´s Minimum Essential Medium“                                          |
| FACS                          | Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer („fluorescence activated cellsorter“) |
| FCS                           | fötales Kälberserum („fetal calf serum“)                                    |
| FcεRI                         | Fcε Rezeptor I                                                              |
| FITC                          | Fluorescein Isothiocyanat Dextran                                           |
| FoxP3                         | „Forkhead Box P3“                                                           |
| FSC                           | „forward scatter“                                                           |
| g                             | Gramm                                                                       |
| GCN2                          | „general control nonrepressed 2“                                            |
| GITR                          | „glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor“                     |
| GM-CSF                        | Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor                      |
| GVHD                          | „graft-versus host disease“                                                 |
| h                             | Stunde                                                                      |
| H <sub>2</sub> O              | Wasser                                                                      |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid                                                          |
| HIV                           | Humanes Immundefizienz-Virus                                                |
| HPLC                          | „High pressure liquid chromatography“                                       |
| I.U.                          | „international unit“                                                        |
| IDO                           | Indolamin-2,3-Dioxygenase                                                   |
| IFN                           | Interferon                                                                  |
| Ig                            | Immunglobulin                                                               |



|          |                                                                         |
|----------|-------------------------------------------------------------------------|
| IL       | Interleukin                                                             |
| IMDM     | „Iscoe´s Modified Dulbecco´s Media“                                     |
| in       | intranasal                                                              |
| iTreg    | induzierte regulatorische T-Zellen                                      |
| kB       | Kilobasen                                                               |
| kV       | Kilo-Volt                                                               |
| Kyn      | Kynurenine                                                              |
| L        | Liter                                                                   |
| LB       | Luria Bertani                                                           |
| LK       | Lymphknoten                                                             |
| LPS      | Lipopolysaccharid                                                       |
| M        | Mol                                                                     |
| mAU      | Milli-Absorptionseinheit                                                |
| MBP      | „myelin basic protein“                                                  |
| McH      | Methacholin                                                             |
| mFU      | relative Fluoreszenz                                                    |
| mg       | Milligramm                                                              |
| MHC      | Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex („major histocompatibility complex“) |
| min      | Minute                                                                  |
| ml       | Milliliter                                                              |
| MLR      | Gemischte Lymphozyten-Reaktion („mixed lymphocyte reaktion“)            |
| mM       | Millimol                                                                |
| mm       | Millimeter                                                              |
| mRNA     | “messenger RNA”                                                         |
| Na       | Natrium                                                                 |
| NFκB     | „nuclear factor κB“                                                     |
| ng       | Nanogramm                                                               |
| NK-Zelle | natürliche Killerzelle                                                  |
| nm       | Nanometer                                                               |
| NOD      | „Nonobese Diabetic“                                                     |
| nTreg    | natürliche regulatorische T-Zellen                                      |

|                  |                                                                                   |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Ø                | Durchmesser                                                                       |
| OD               | optische Dichte                                                                   |
| OPD              | Orthonitrophenoldiamin-Dihydrochlorid                                             |
| OVA              | Ovalbumin                                                                         |
| P                | Druck                                                                             |
| PAMP             | Pathogen-assoziierte molekulare Muster („pathogen-associated molecular patterns“) |
| PBS              | „phosphate buffered saline“                                                       |
| PCR              | Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase chain reaction“)                          |
| pDC              | plasmazytoide Dendritische Zelle                                                  |
| PE               | Phycoerythrin                                                                     |
| Pen/Strep        | Penicillin/Streptomycin                                                           |
| PenH             | “enhanced pause”                                                                  |
| PFA              | Paraformaldehyd                                                                   |
| PGE <sub>2</sub> | Prostaglandin E2                                                                  |
| pH               | pondus Hydrogenii                                                                 |
| psi              | pound per square inch                                                             |
| PVP              | Polyvinylpyrrolidon                                                               |
| Q-PCR            | quantitative PCR                                                                  |
| rhu              | recombinant human                                                                 |
| RNA              | Ribonukleinsäure                                                                  |
| rpm              | Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)                                      |
| RPMI             | „Roswell Park Memorial Institute“                                                 |
| RT               | Raumtemperatur                                                                    |
| RUNX             | “Runt-related transcription factor”                                               |
| Σ                | Summe                                                                             |
| sc               | subkutan                                                                          |
| SCF              | Stammzellfaktor („stem cell factor“)                                              |
| SDS              | Sodiumdodecylsulfat                                                               |
| sec              | Sekunde                                                                           |
| SIT              | spezifische Immuntherapie                                                         |
| SOCS 3           | “Suppressor of cytokine signalling 3”                                             |
| SSC              | „side scatter“                                                                    |

|          |                                                |
|----------|------------------------------------------------|
| TAE      | Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure       |
| TC       | T-Zelle („t cell“)                             |
| TCR      | T-Zell-Rezeptor („t cell receptor“)            |
| TGF      | „Transforming Growth Factor“                   |
| Th-Zelle | T-Helfer-Zelle                                 |
| TLR      | Toll-ähnlicher Rezeptor („Toll-like-receptor“) |
| TNF      | Tumor-Nekrose-Faktor                           |
| Treg     | regulatorische T-Zelle                         |
| Trp      | Tryptophan                                     |
| U        | Units                                          |
| u.a.     | unter anderem                                  |
| UBC      | Ubiquitin C                                    |
| UV       | Ultraviolett                                   |
| V        | Volt                                           |
| x g      | Zentifugalbeschleunigung                       |
| z.B.     | zum Beispiel                                   |
| ZVTE     | Zentrale Versuchstiereinrichtung               |
| β-Gal    | β-Galaktosidase                                |
| Σ        | Summe                                          |
| Ω        | Ohm                                            |

**F) Lebenslauf**