

Einfluss von CpG auf die Funktion dendritischer Zellen im Rahmen pulmonaler Entzündungsreaktionen im Mausmodell

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biotechnol. Hannelore-Susanne Constabel
geb. am 30.08.1968 in Haldensleben

2010

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller

Korreferent: Prof. Dr. med. Georg M.N. Behrens

Tag der Promotion: 19. Februar 2010

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	6
Abstract.....	7
1. Einleitung.....	8
1.1 Die allergische asthmatische Entzündungsreaktion.....	8
1.1.1 Das klinische Bild der allergischen Reaktion der Atemwege	8
1.1.2 Pulmonale Entzündungsreaktionen im Mausmodell	10
1.1.3 Therapie pulmonaler Entzündungsreaktionen	11
1.1.4 CpG-ODN als Therapeutika	12
1.1.5 Mechanismen der inhibitorischen Wirkung von CpG-ODN	14
1.2 Molekularbiologie von CpG-ODN	16
1.2.1 Toll-ähnliche Rezeptoren und ihre Liganden	16
1.2.2 Signaltransduktion und -wirkung nach Interaktion von TLR9 und CpG-ODN...	17
1.2.3 Molekülstruktur und Aktivität von CpG-ODN	19
1.3 Dendritische Zellen	20
1.3.1 Die Subtypen dendritischer Zellen in der Maus	21
1.3.2 Pulmonale dendritische Zellen	22
1.3.3 Antigenaufnahme und Antigenpräsentation.....	24
1.3.4 Migration.....	26
1.4 Hypothese.....	28
2. Ergebnisse	30
2.1 Reduktion der allergischen Entzündungsreaktion im klassischen Asthmamodell durch CpG.....	30
2.2 Th2-Asthmamodell.....	31
2.2.1 Generierung von Th2-Zellen	32
2.2.2 Etablierung des Th2-Asthmamodells.....	33
2.2.3 Reduktion der allergischen Entzündungsreaktion durch CpG im Th2-Asthmamodell.....	35
2.3 Optimierung der Isolierung von dendritischen Zellen.....	38
2.3.1 DC aus der Lunge.....	38
2.3.2 DC aus den mediastinalen Lymphknoten	45

2.4	Untersuchung des Effekts von CpG auf die pulmonalen DC	49
2.4.1	Maturierung pulmonaler DC durch CpG	49
2.4.2	<i>In vivo</i> – Antigenpräsentation nach CpG-Applikation.....	50
2.4.3	<i>Ex vivo</i> Analyse der Präsentation von endogenem prozessiertem Antigen durch die DC aus den mediastinalen LK	52
2.4.4	Untersuchung der Antigenpräsentation isolierter pulmonaler DC <i>in vitro</i>	55
2.4.5	Untersuchung der Antigenpräsentation isolierter DC aus der Lunge von sensibilisierten Mäusen	58
2.4.6	Untersuchung des Migrationsverhaltens pulmonaler DC nach CpG-Gabe	60
2.4.7	Restauration der Antigenpräsentation in den mediastinalen LK	64
2.4.8	Analyse der Expression des Chemokinrezeptor 7 und seiner Liganden	66
3.	Diskussion	69
3.1	CpG reduziert pulmonale allergische Entzündungsreaktionen in Mausmodellen....	69
3.2	Der Einfluss der CpG-Behandlung auf die Anzahl DC in der Lunge und den mediastinalen LK	73
3.2.1	Optimierung der Isolierung von DC	73
3.2.2	Der Einfluss von CpG auf die Anzahl pulmonaler DC.....	75
3.3	CpG aktiviert die pulmonalen DC, inhibiert aber nicht die Antigenpräsentation	78
3.4	CpG inhibiert die Migration pulmonaler DC	83
4.	Material und Methoden	89
4.1	Mausstämme	89
4.2	Materialien	90
4.2.1	Kulturmedien und Puffer	90
4.2.2	Reagenzien.....	91
4.2.3	Nycodenz.....	94
4.2.4	Depletionscocktails	95
4.2.5	Antikörper für FACS.....	96
4.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	97
4.4	Asthmamodelle	99
4.5	Analyse der BAL	100
4.6	Histologie	100

4.7	Isolierung von T-Zellen.....	101
4.8	Generierung von Th2-Zellen	102
4.9	IL-4 – ELISpot-Assay	102
4.10	Isolierung von dendritischen Zellen.....	103
4.11	Generierung von BM-DC.....	105
4.12	Antikörperfärbung und Zellsortierung	106
4.13	Labeln von Zellen mit CFSE.....	106
4.14	Proliferationsassays.....	107
4.15	Migrationsassays	108
4.16	RT-PCR	109
4.17	Statistische Analysen.....	110
5.	Literaturverzeichnis	111
6.	Abkürzungsverzeichnis	125
7.	Anhang	129
7.1	Danksagung.....	129
7.2	Lebenslauf	130
7.3	Publikationsverzeichnis.....	131
7.4	Erklärung zur Dissertation	132

Schlagwörter: Immunstimulatorische Oligonukleotide, Dendritische Zellen,
Allergisches Asthma, Migration

Keywords: Immunostimulatory Oligonucleotides, Dendritic Cells, Allergic Airway
Inflammation, Migration

Zusammenfassung

Die Entstehung allergischer Entzündungen der Atemwege kann durch die Instillation unmethylierte CpG-Motive enthaltender Oligonukleotide (CpG-ODN) verhindert werden. Die dem zugrunde liegenden Mechanismen wurden bisher über Wirkungen auf die antigenspezifischen Th2-Zellen erklärt. Die Ursache könnte bereits bei den die T-Zellen aktivierenden dendritischen Zellen (*engl.: dendritic cells*, DC) liegen. Die DC werden durch CpG-ODN aktiviert und regulieren im Zuge der Maturierung ihre Kapazität der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I- als auch MHC-Klasse-II-Ebene herunter. Die daraus resultierende Inhibition der Präsentation nachfolgend verabreichter Antigene könnte auch die inhibitorische Wirkung von CpG-ODN bei der Entstehung von asthmatischen Reaktionen erklären. In dieser Arbeit wurde mit CpG-ODN 1668 (CpG) in einem klassischen murinen Asthmamodell sowie in einem Th2-Asthmamodell die pulmonale allergische Inflammation reduziert. Dies wurde anhand einer verminderten Eosinophilie in der bronchoalveolären Lavage als auch dem reduzierten Zellinflux in das Lungenparenchym gezeigt. Das verwendete Antigen Ovalbumin (OVA) wurde in den mediastinalen Lymphknoten (LK) von 24 h zuvor mit CpG behandelten Mäusen nicht an adoptiv transferierte antigenspezifische T-Zellen präsentiert. Die stark reduzierte Präsentation des intranasal applizierten Antigens war ebenso zu erkennen, wenn die einen Tag nach der Antigenprovokation aus den mediastinalen LK der CpG-behandelten Tiere isolierten DC *in vitro* zur T-Zellstimulation eingesetzt wurden. Die direkte Analyse, bei der die 24 h nach der CpG-Behandlung isolierten pulmonalen DC *in vitro* mit dem Antigen inkubiert wurden, stellte jedoch heraus, dass ihre Fähigkeit der Antigenpräsentation nicht reduziert war. Korrelierend zu der erhöhten Expression der Moleküle MHC-II, CD80 und CD86 präsentierten sie sogar OVA-Peptid besser als DC aus unbehandelten Tieren. Die weitere Untersuchung der DC aus der Lunge zeigte auch, dass ihre Endozytosekapazität *in vivo* durch die Gabe von CpG nicht eingeschränkt war. Allerdings wurde die Migration der Lungen-DC in die mediastinalen LK stark inhibiert. Dabei hatte CpG keinen reduzierenden Effekt auf die Expression des Chemokinrezeptors CCR7, wohingegen die mRNA-Level seiner Liganden CCL19 und CCL21 in den mediastinalen LK erniedrigt waren. Aus dem Knochenmark generierte intranasal transferierte DC wurden durch das veränderte Chemokinmilieu in ihrer Migration nicht beeinträchtigt. Daher konnte mit ihrer Applikation kurz vor der OVA-Provokation die Migration kompensiert und damit die Antigenpräsentation *in vivo* wiederhergestellt werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die CpG-Behandlung nicht die Antigenpräsentation jedoch die Migration pulmonaler DC inhibierte, was zur Reduktion der T-Zell-Aktivierung führte und die Verminderung der asthmatischen Inflammation zur Folge hatte.

Abstract

CpG-containing oligonucleotides (CpG-ODN) have been shown to reduce key features of allergic airway inflammation in mouse models. Up to now underlying mechanisms have been attributed to the effect of CpG-ODN on antigen-specific Th2 cells. Given the inhibitory effects of CpG-ODN treatment on antigen presentation of subsequently encountered antigens via MHC class I and II molecules by dendritic cells (DC), we hypothesized that intranasal CpG treatment would lead to reduced antigen-specific T cell stimulation in the lung-draining lymph nodes, thereby reducing the inflammatory response in sensitized mice. In this study allergic airway inflammation was reduced in a sensitization-model with Ovalbumin (OVA) as well as in an adoptive transfer model of antigen-specific Th2 cells using CpG-ODN 1668 (CpG), as was shown by diminished airway eosinophilia and pulmonary infiltration. Intranasal CpG administration led to phenotypic maturation of lung and mediastinal lymph node DC as determined by expression of MHC class II, CD80, and CD86. This was accompanied by a significant reduction in the proliferation of adoptively transferred antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in mediastinal lymph nodes, when CpG was given before inhalative OVA challenges. DC obtained from mediastinal lymph nodes of CpG-treated mice before OVA inhalation led to reduced T cell stimulation of *in situ* in lung encountered antigen via MHC class I and II molecules. Distinct from this outcome CpG had no inhibitory effect on the constitutive MHC class II antigen presentation of protein-derived antigen by pulmonary DC, when 24 h after CpG treatment isolated DC were pulsed with antigen *in vitro*. Compatible with the augmented MHC class II level they even presented OVA-peptide better than DC obtained from untreated mice. Further analysis of lung tissue-derived DC showed no impairment of their capacity to endocytose OVA but revealed inhibition of lung DC migration following CpG administration. These results were explained by reduced mRNA levels of chemokine ligands CCL19 and CCL21 in mediastinal lymph nodes, whereas the expression of their receptor CCR7 on pulmonary DC was not decreased. The altered environment had no impact on the migration of bone marrow-derived DC (BM-DC). Hence intranasal transfer of BM-DC could compensate migration of lung DC in CpG-treated mice resulting in restored antigen presentation of OVA in the mediastinal LN to adoptively transferred antigen-specific CD4⁺ T cells. In summary, there was no inhibitory effect of CpG on antigen presentation of pulmonary DC but CpG treatment impaired the DC-mediated antigen transport from the lungs to the lymph nodes, resulting in reduced T cell activation and blunted airway inflammation.

1. Einleitung

1.1 Die allergische asthmatische Entzündungsreaktion

Die Inzidenz des Asthma bronchiale ist in den industrialisierten Ländern in den letzten Jahren beständig gestiegen. Die Ursachen für diese Erkrankung liegen in den veränderten Umweltbedingungen als Folge der Modernisierung in den durch den westlichen Lebensstil geprägten Ländern sowie einer verbesserten Hygiene und Gesundheitsfürsorge [126]. In Bezug auf die immer noch nicht hinreichend verstandenen Mechanismen der Krankheitsentstehung ist weitere Aufklärungsarbeit notwendig, um neue, effizientere und für den Patienten verträglichere Therapieansätze entwickeln zu können.

1.1.1 Das klinische Bild der allergischen Reaktion der Atemwege

Allergisches Asthma ist ein komplexes Syndrom mit vielen klinischen Phänotypen, das durch variable Grade bronchialer Hyperreaktivität (BHR) und Inflammation der Atemwege gekennzeichnet ist. Hypersekretion von Schleim, allergische Schwellung der Mukosa und Spasmus der Bronchialmuskulatur bewirken die zu anfallsweise auftretender Atemnot führende Bronchialobstruktion [13]. Die Hyperreaktivität der Atemwege zeigt sich in der erhöhten Konstriktion der Bronchien infolge verschiedener Stimuli wie beispielweise Methacholin. Immunhistopathologisch stellt sich die allergische Entzündungsreaktion durch Infiltration mit Neutrophilen und Eosinophilen, der Verdickung der Basalmembran und Hyperthrophie der glatten Muskulatur der Bronchien sowie Hyperplasie der Becherzellen dar. Ebenso beinhaltet das Bild den Verlust der Integrität der respiratorischen Epithelialzellen und die Okklusion des Bronchienlumens. Die allergische Reaktion der Atemwege wird durch Antikörper des Typs Immunglobulin E (IgE) vermittelt. Das von B-Zellen synthetisierte und freigesetzte IgE zirkuliert im Blut und bindet an die hochaffinen IgE-Rezeptoren auf der Oberfläche der Mastzellen und peripheren Basophilen im Blut, die daraufhin Entzündungsmediatoren ausschütten. Weiterhin ist die allergische Reaktion durch die Produktion von Th2-Cytokinen, wie die Interleukine IL-4, IL-13 und IL-5 als auch durch IL-10 Freisetzung, gekennzeichnet. Für die Polarisation der CD4⁺ T-Zellen zu Th2-Zellen ist das Cytokinmilieu während der Stimulation der T-Zellen, die durch die Präsentation der vom Allergen abstammenden Peptide im Kontext von Klasse-II-Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*engl.: major histocompatibility complex*, MHC) durch dendritische Zellen (*engl.: dendritic cells*, DC) erfolgt, verantwortlich. Die erhöhte Expression der Th2 assoziierten Cytokine ist anhand der Messenger-RNA (mRNA) in Zellen und im

Lungengewebe als auch der Proteine in der bronchoalveolären Lavage (BAL) nachzuweisen. IL-4 und IL-13 spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des Isotypenwechsels der Immunglobulinklasse zum IgE. IL-13 ist erforderlich für die Atemwegshyperreaktivität und die Schleimproduktion. Das Cytokin IL-5 stimuliert die Freisetzung von eosinophilen Granulozyten in die Zirkulation und verlängert ihre Überlebensdauer [125,126]. Die bedeutende Rolle von IL-5 für die Differenzierung, Rekrutierung und Aktivierung der Eosinophilen ist aus Abb.1.1 ersichtlich.

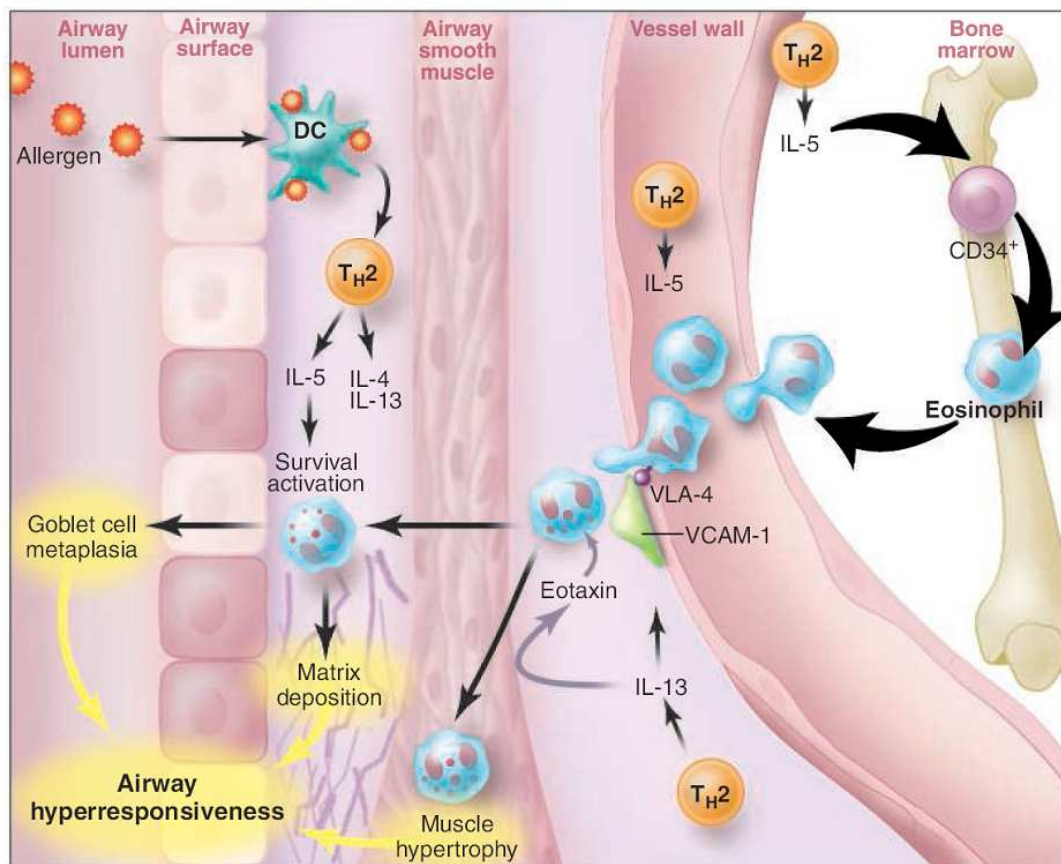


Abb.1.1 Eosinophile im Kontext der allergischen Entzündungsreaktion der Atemwege.

Die Präsentation des Allergens durch die dendritischen Zellen (*engl.: dendritic cells, DC*) führt zur Differenzierung von Th2-Zellen und der Produktion der Th2-Cytokine IL-4, IL-13 und IL-5. Unter dem Einfluss von IL-5 entwickeln sich aus den Vorläuferzellen im Knochenmark Eosinophile, die dann unter Mitwirkung des Chemokins Eotaxin in die Luftwege rekrutiert werden. Dort tragen sie, nach Aktivierung durch IL-5, zur Pathogenese der allergischen Entzündungsreaktion bei, indem sie auf Zellen in den Wänden der Atemwege wirken oder zusätzliche Th2-Cytokine sekretieren. Diese Effekte können bei erhöhter Sensitivität der Atemwege als Reaktion auf verschiedene Stimuli in Atemwegshyperreaktivität, verstärkter Schleimproduktion und ~sekretion und Ablagerungen von Kollagen an der Basalmembran resultieren. (Bildquelle: Wills-Karp&Karp, *Science* 2004)

Nach der Antigenprovokation sind neutrophile Granulozyten die ersten inflammatorischen Zellen, die in den Atemwegen akkumulieren. Der transienten Erhöhung der Neutrophilen folgt anschließend der Influx von Lymphozyten und Eosinophilen [107,108]. Die infiltrierenden Zellen werden in der BAL wiedergefunden, wobei insbesondere die Anzahl der Eosinophilen als wesentlicher Hauptmarker für die Definition des Ausmaßes der allergischen pulmonalen Entzündungsreaktion gilt.

1.1.2 Pulmonale Entzündungsreaktionen im Mausmodell

Zur Induktion allergischer asthmaähnlicher Entzündungsreaktionen in Mäusen sind allgemein zwei Phasen notwendig. Zuerst erfolgt die antigenspezifische Sensibilisierung der Mäuse, in der zweiten sogenannten Expositionsphase werden die Tiere mit dem Antigen provoziert. Nach der Provokation bilden die Tiere dann die Inflammation entzündlicher Zellen in die Atemwege aus und entwickeln die Atemwegshyperreaktivität.

In den klassischen Asthmodellen werden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion des Antigens zusammen mit einem Adjuvant sensibilisiert (meist Aluminiumhydroxid, Alum), dass die Polarisation der CD4⁺ T-Zellen zu Th2-Zellen fördert. Die Sensibilisierung induziert die Produktion von antigenspezifischem IgE [58]. Die verschiedenen Modelle, über die in der Literatur berichtet wurde, variieren im verwendeten Mausstamm, in der methodischen Ausführung von Sensibilisierung und Antigenprovokation und letztendlich in dem Zeitpunkt der Analyse der Tiere nach der Exposition. Das am häufigsten verwendete Antigen zur Induktion einer eosinophilen Atemwegsentzündung ist Ovalbumin (OVA), obwohl einige Experimentatoren auch schon die bedeutenderen Allergene von der Hausstaubmilbe oder Küchenschabe genutzt haben. Der Periode der Sensibilisierung, die durch eine einzelne oder bis zu drei wöchentlich wiederholte Injektionen von OVA/Alum bestimmt ist, folgt 10-14 Tage später die Phase der Provokation in Form einer einzelnen als auch drei bis sieben täglich wiederholten 15-60-minütigen Inhalationen von OVA-Aerosol oder intranasaler Applikation von gelöstem OVA. Der Zeitpunkt der Durchführung der finalen Analyse variiert von 3 bis 48 Stunden nach der letzten Antigenexposition. Die Bestimmung der Atemwegsinflammation erfolgt hauptsächlich durch immunhistologische Untersuchungen der Lunge sowie zelluläre Analyse der BAL-Flüssigkeit. In einigen Fällen ist es auch möglich, die bronchiale Hyperreaktivität gegenüber inhalierten bronchokonstruktiven Agenzien, wie z.B. Metacholin oder Serotonin, mittels invasiver oder nicht invasiver Messung zu demonstrieren [110].

Eine Alternative zum klassischen Asthmodell ist das von Cohn und Bottomly in BALB/c-Mäusen entwickelte *in vivo*-System, in dem antigenspezifische Th2-Zellen eine

inflammatorische Antwort induzieren, die ähnliche pathologische Merkmale, wie die für die allergische asthmatische Erkrankung beschriebenen, aufweist [18,19]. In diesem Th2-Modell wird die Phase der Sensibilisierung durch den adoptiven Transfer von *in vitro* polarisierten OVA-spezifischen CD4⁺ Zellen ersetzt. Durch die Inhalation von OVA während der an 7-10 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführten Provokation werden die OVA-spezifischen Th2-Zellen in den Respirationstrakt rekrutiert und dort lokal aktiviert.

1.1.3 Therapie pulmonaler Entzündungsreaktionen

In der letzten Dekade war die Behandlung von Asthma auf die Langzeitunterdrückung der Atemwegsentzündung und die Bekämpfung der Symptome mit schnell wirkenden Bronchodilatoren ausgerichtet. Bei schweren Anfällen sind inhalierte Corticosteroide die effektivsten Agenzien zur symptomatischen Kontrolle von Asthma sowie der Verbesserung der Lungenfunktion, die potentiellen Nebeneffekte führten jedoch zur Anwendung von adjunktiven Therapien. Die dabei angewendete gleichzeitige Behandlung mit langanhaltenden Betaantagonisten und Leukotrinantagonisten kann dazu beitragen, Asthma zu kontrollieren und die benötigte Corticosteroiddosis zu minimieren. Eine Therapie, die zu einer dauerhaften Heilung führt, steht jedoch immer noch aus. Daher werden andere Ansätze verfolgt und entwickelt, wie die Anwendung herkömmlicher Immuntherapien oder der Einsatz molekularer Methoden zur Herunterregulation der antigenspezifischen Th2-vermittelten Antwort, wie beispielsweise Agenzien, die mit der Produktion von IgE oder IL-4 interagieren [13].

Ein weiterer erfolgversprechender Therapieansatz liegt in der Entwicklung von DNA-Vakzinen, die in der Annahme der Hygienehypothese begründet ist. Die Hygienehypothese geht von einer inversen Beziehung von Expositionen in der frühen Lebensphase unter verschiedenen Rahmenbedingungen mit der Prävalenz von atopischen Erkrankungen, einschließlich Asthma, aus. Die verminderte Exposition gegenüber Mikroben während der Kindheit erhöht danach das Risiko atopischer Erkrankungen. Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch mikrobielle Produkte könnte somit zur Lösung des bestehenden Problems unzureichender Therapien beitragen [61]. In bakterieller DNA wurden unmethylierte CpG-Motive entdeckt, die eine immunstimulatorische Wirkung haben. Aus mikrobieller Sicht kann diese CpG-DNA genutzt werden, um bakterielle Infektionen zu imitieren und damit ein Milieu zu induzieren, das eine Immunantwort vom Th1-Typ fördert [37]. Hierin stimuliert das exprimierte Interleukin-12 die Polarisation der CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen, similar der Rolle des IL-4 bei der Induktion einer Th2-Antwort. Übereinstimmend mit der Hygienehypothese ist mit dem Rückgang der Inzidenz vieler Infektionskrankheiten aufgrund von Impfungen, der Benutzung von Antibiotika und anderer gesundheitspolitischer

Maßnahmen eine Hauptquelle von Th1-Immunprovokationen verloren gegangen, in dessen Konsequenz der Anstieg Th2- basierter Immunantworten gegenüber Umweltallergenen liegt. Daher repräsentieren auf CpG-DNA basierende Immuntherapeutika eine neue und vernünftige Anwendung für die Behandlung von allergischen asthmatischen Erkrankungen [44]. Synthetische Oligodesoxynukleotide, die denen in bakterieller DNA gefundenen ähnliche CpG Motive enthalten (CpG-ODN), stimulieren eine similare Th1-Antwort und haben verschiedenes immunmodulatorisches Potential [65].

1.1.4 CpG-ODN als Therapeutika

Für den Einsatz von CpG-ODN zu Therapie Zwecken wurden vier Hauptanwendungen entwickelt [65]. Zunächst wird das Potential von CpG-ODN, eine angeborene Immunantwort hervorzurufen, genutzt, um den Schutz von Wirtsorganismen vor Infektionen mit verschiedenen pathogenen Mikroorganismen zu verbessern. In Mäusen wurde gezeigt, dass die Injektion von bakterieller DNA oder CpG-ODN vor der Provokation mit diversen Bakterien und Viren die Resistenz der behandelten Tiere gegenüber diesen Erregern stark erhöht. Die Behandlung mit CpG-ODN kann sogar in immunsuppressiven Wirten die Fähigkeit, eine adaptive Immunantwort auszubilden, steigern. Weiterhin dienen CpG-ODN als Adjuvantien für Vakzine. Da sie die Expression von Th1-Typ- und proinflammatorischen Cytokinen fördern und professionelle antigenpräsentierende Zellen (*engl.: antigen presenting cells, APC*) maturieren und aktivieren, unterstützen sie die Immunogenität von gleichzeitig verabreichten Antigenen. Durch eine stabile Konjugation von Adjuvant und Antigen kann der Effekt um das zehnfache bis tausendfache verstärkt werden. Als Drittes werden CpG-ODN in der Krebstherapie eingesetzt. Durch die Auslösung einer Kaskade von Immunreaktionen, die in der Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und cytotoxischen T-Zellen (*engl.: cytotoxic T lymphocytes, CTL*) resultieren, wird die Behandlung von Krebs, durch Anwendung von CpG-ODN allein oder in Kombination mit anderen Therapien, erleichtert. Schließlich kann mit der Applikation von CpG-ODN in Kombination mit Allergenen, wodurch eine antigenspezifische Th1-Antwort stimuliert wird, die Entwicklung von Th2-vermittelten allergischen Erkrankungen verhindert werden.

Die Inhibition von allergischen Entzündungsreaktionen in der Lunge ist in verschiedenen Mausmodellen gezeigt worden. In der initialen Studie wurde an einem murinen Asthma-modell mit Schistosoma-Eiern als Antigen demonstriert, dass CpG-ODN die Eosinophilie sowie den IL-4-Level in der BAL, die BHR und das IgE im Serum reduzierte, während die Cytokinlevel von IFN γ und IL-12 in der BAL anstiegen [64]. Diese Ergebnisse wurden in einem klassischen OVA-Asthma-modell bestätigt. Die Applikation von CpG-ODN hatte auch hier einen inhibitorischen Effekt auf die eosinophile Inflammation der Atemwege, die BHR

und die Ausbildung des allergenspezifischen Th2 basierten Immunprofils [11]. Zudem wurde in dieser Studie gezeigt, dass die Eosinophile, außer in der BAL, im Lungenparenchym, im Blut und im Knochenmark reduziert war, ein Hinweis darauf, dass die Behandlung mit CpG-ODN auch die Akkumulation der Eosinophilen in der Lunge und die Differenzierung ihrer Vorstufen inhibierte. Die Inhibition der Eosinophile war mit einer niedrigeren Expression von IL-5, GM-CSF und IL-3, aber nicht erhöhter Apoptose der Eosinophilen, assoziiert. Ebenfalls in murinen Modellen, in denen Ambrosienpollen als Allergen eingesetzt wurden, lieferte die Gabe von CpG-ODN an sensibilisierte Mäuse einen Schutz gegen die darauffolgende Allergenprovokation der Atemwege [91,102]. Dabei wurde die inhibierende Wirkung von CpG-ODN in einem Langzeitmodell auch noch sechs Wochen nach der letzten CpG-ODN-Administration nachgewiesen. Der Langzeitschutz war mit einem erhöhten Verhältnis von IFN γ zu IL-4 sekretierenden Zellen und der Inhibition der Expansion der allergenspezifisches IgE exprimierenden B-Zell-Klone verbunden [102]. Neben den bisher beschriebenen Parametern zur Bezeichnung der allergische Inflammation in der Lunge wurde der Effekt der CpG-ODN-Behandlung auch hinsichtlich der Ummodulierung der Atemwege, die sich in subepithelialer Fibrose, vermehrtem Lungenkollagengehalt und Becherzellhyperplasie ausdrückt, untersucht. Similare Resultate der inhibitorischen Wirkung von CpG-ODN wurden dafür in chronischen Asthmodellen, die durch die Sensibilisierung und Provokation mit OVA [49,131] als auch einem Allergen von der Hausstaubmilbe [57] induziert wurden, sowie einem allergischen Aspergillosemodell der Atemwegsinfammation [5] gefunden.

Die Administration von CpG-ODN ist zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt worden. Allergisches Asthma konnte durch die Gabe von CpG-ODN während der Sensibilisierungsphase reduziert oder eliminiert werden [11,91,102], auch die Verabreichung von CpG-ODN nach der Sensibilisierungsphase reduzierte merklich die Schwere der Erkrankung [91,102]. Ebenso waren CpG-ODN effektiv, wenn sie bis zu sechs Tage vor der Allergenprovokation gegeben wurden [11]. Die Applikationsform ist mit entscheidend für den Erfolg der CpG-ODN-Behandlung. In einem etablierten Asthmodell wurde durch subkutane Injektion von CpG-ODN oder dem Allergen OVA allein keine Reduktion der inflammatorischen und physiologischen Effekte erzielt, nur durch Kombination der beiden konnte die Entzündungsreaktion verringert werden [63]. Wurde CpG-ODN vor der Allergenexposition dagegen über die Atemwegsmukosa appliziert, war schon die Administration von CpG-ODN allein effektiv, um die Inflammation zu reduzieren [50]. Auch andere Studien haben gezeigt, dass die mukosale Route der Administration der effektivere Weg der immunmodulatorischen Behandlung von atopischen Atemwegserkrankungen ist [95,103]. Mit der oralen Form der CpG-ODN-Applikation konnte ebenfalls eine effiziente Wirkung nach gewiesen werden,

obwohl die für die Prävention oder Therapie benötigte CpG-ODN-Dosis um eine Größenordnung höher lag als die für mukosale oder systemische Routen verwendete [59].

Schließlich ist demonstriert worden, dass OVA-CpG-ODN-Konjugate 100mal effizienter bei der Verhinderung einer Atemwegseosinophilie und BHR sind als die Komponenten allein oder OVA und CpG-ODN zusammen [94].

Im Menschen wurden bisher viele Phase I-Studien zur Austestung der Sicherheit und der immunmodulatorischen Fähigkeiten von CpG-ODN durchgeführt. Mehrere Phase II-Studien zur Evaluierung der Effektivität von CpG-ODN in der Behandlung von Allergien, Asthma, Krebs oder als Vakzinadjuvant sind in Gang [65]. In Patienten mit atopischem Asthma wurde nach einer vierwöchigen CpG-ODN-Therapie und anschließender inhalativer Allergenprovokation nur die erhöhte Expression von IFN γ und IFN γ -assoziierten Genen nachgewiesen, jedoch keine Reduktion der BHR oder allergeninduzierten Eosinophile der Atemwege gesehen [26].

1.1.5 Mechanismen der inhibitorischen Wirkung von CpG-ODN

Die Induktion von Th1-Antworten durch CpG-ODN führte zur ersten Erklärung eines möglichen Mechanismus auf der Grundlage der Hygienehypothese. Da die Th1-Antworten ein Gegengewicht zu den mit atopischen Erkrankungen assoziierten, durch die Cytokine IL-4, IL-5 und IL-13 charakterisierten Th2-Immunantworten bilden, wurde angenommen, dass die induzierten Th1-Cytokine IL-12 und IFN γ die antiinflammatorischen Effekte von CpG-ODN vermitteln könnten. Sowohl von IL-12 als auch von IFN γ gibt es Daten darüber, dass sie einige der protektiven Effekte von CpG-ODN in Allergiemodellen vermitteln. So wurde in IFN γ ^{-/-}-Mäusen gezeigt, dass die Administration von CpG-ODN nicht die Rekrutierung von Eosinophilen zu inhibieren vermochte, was eine kritische Rolle für IFN γ in der Vermittlung von CpG-ODN bedingten Effekten anzeigte [102]. In einem weiteren Experiment wurde mit Hilfe der Neutralisierung der Cytokine herausgefunden, dass die CpG-ODN vermittelte antiallergische Immunmodulation im verwendeten Asthmodell von der Produktion von IL-12, IFN α/β und IFN γ abhängig ist [11]. CpG-ODN-Antigen-Konjugate induzierten *in vitro* die Th1-Differenzierung in einer IL-12 abhängigen Weise [94]. In anschließenden Studien wurde allerdings gefunden, dass weder IFN γ noch IL-12 zur Verhinderung der asthmatischen Inflammation durch CpG-ODN benötigt wurden. Unter der Verwendung von IFN γ defizienten Mäusen (*engl. „knockout-mouse“*, KO-Maus), IL-12 KO-Mäusen und IFN γ /IL-12 doppelt KO-Mäusen wurde gezeigt, dass sowohl Eosinophilie als auch BHR in Abwesenheit von IFN γ oder IL-12 durch CpG-ODN reduziert werden konnten, obwohl dazu zehnmal mehr CpG-ODN benötigt wurde [62]. In einem durch Wurmeier der

Gattung *Schistosoma* induzierten Asthmamodell wurde die Immunisierung mittels CpG-ODN durch einen IL-12 unabhängigen Mechanismus erreicht [16]. Die kontroversen Resultate über die Rolle von IFN γ und IL-12 suggerierten, dass der Übergang von einer Th2- zu einer Th1-Antwort keine adäquate Erklärung für den protektiven Effekt von CpG-ODN war. Auf Cytokinebene könnte dem regulatorischen Interleukin-10 eine Bedeutung bei der Vermittlung des CpG-ODN-Effekts zukommen. So wurde demonstriert, dass die Inhibition der Th2-Antwort die Hochregulation von IL-10 mit einschließt [16] und CpG-ODN in Abwesenheit von IL-10 eine viel stärkere Th1-Antwort induzierte [60].

Die durch CpG-ODN induzierten Interferone stimulieren die Expression von Indolamin-2,3-desoxygenase (IDO), dem geschwindigkeitsbegrenzenden Enzym bei der Katalyse der essentiellen Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin, und regulieren darüber die Funktion der T-Zellen [80]. Es gibt auch Daten, die auf die Notwendigkeit von IL-12 für die Expression von IDO hinweisen [35]. In einem murinen Asthmamodell wurde der Beweis geliefert, dass CpG-ODN durch die Induktion von IDO die allergische Antwort inhibiert. Durch die Administration eines pharmakologischen Inhibitors von IDO wurde die IDO-Aktivität gehemmt, was an den erniedrigten Kynurenin-Werten ersichtlich war. Parallel dazu wurde der antiallergische Effekt von CpG-ODN und damit die Verhinderung der Atemwegsinflammation wieder aufgehoben [35]. Die Expression von IDO wird mit der Regulation der durch T-Zellen vermittelten adaptiven Immunität in der Hinsicht assoziiert, dass die Induktion von IDO in Toleranz resultiert. Die Induktion von IDO durch CpG-ODN weist daher zusammen mit dem erhöhten IL-10-Level auf eine Rolle für regulatorische T-Zellen in der Vermeidung der Manifestation von atopischem Asthma hin [76].

Aufgrund der kontroversen Daten über IL-12 und IFN γ suchten Hessel und Kollegen nach anderen möglichen Effekten der Aktivität von CpG-ODN. Sie fanden, dass CpG-ODN nicht direkt die Funktionen, die durch die bereits induzierten Th2-Cytokine IL-4 und IL-13 in der Lunge vermittelt werden, inhibiert. CpG-ODN beugt dagegen der antigenabhängigen Aktivierung der Th2-Zellen in der Lunge vor und verändert die Funktion der APC in der Lunge dahingehend, dass sie die Aktivierung der antigenspezifischen Th2-Zellen *in vitro* verhindern, wobei sie weiterhin in der Lage sind, Th1-Zellen zu stimulieren [39].

Mit den bisher aufgezeigten Mechanismen wird die Aktivität von CpG-ODN nicht ausreichend erklärt, weshalb weitere Untersuchungen notwendig sind. Ein interessanter Ansatz wäre es, die Analyse der Wirkung von CpG-ODN auf diverse Zelltypen weiter zu vertiefen und dabei den Fokus auf die APC, die für die Th2-Aktivierung erforderlich sind, und im Besonderen auf die DC zu legen.

1.2 Molekularbiologie von CpG-ODN

1.2.1 Toll-ähnliche Rezeptoren und ihre Liganden

Das Immunsystem funktioniert als ein Zusammenspiel aus angeborener, unspezifischer und erworbener, spezifischer Immunität. Das angeborene Immunsystem stellt die erste Linie der Verteidigung dar, es erkennt die Anwesenheit und die Natur einer Infektion und aktiviert sofort eine schnelle und angemessene Immunantwort, um die Infektion zu bekämpfen. Neben der Verhinderung der frühen Ausbreitung der Infektion induziert das angeborene Immunsystem auch die verzögerte pathogen- und antigenspezifische adaptive Immunantwort und das immunologische Gedächtnis.

Die Erkennung potentieller Pathogene erfolgt durch Mustererkennungsrezeptoren (*engl.: pattern-recognition receptor, PRR*), die hochkonservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*engl.: pathogen-associated molecular pattern, PAMP*) binden. PAMP basieren auf zellulären Komponenten, die für das Überleben der Mikroorganismen essentiell sind. Sie sind innerhalb einzelner Klassen von Mikroorganismen konstant und werden ausschließlich von mikrobiellen Pathogenen exprimiert [46,79]. Zu den drei funktionell unterschiedlichen Klassen der PRR gehören C-Typ-Lektin-ähnliche Rezeptoren, wie der Mannose- und der β -Glykan-Rezeptor, die cytosolischen Rezeptoren mit den beiden Familien der Nukleotid-bindenden Oligomerisierungsdomäne (NOD)-ähnlichen Rezeptoren und der Retinsäure-induzierbare-Gene-1 (RIG-I)-ähnlichen Rezeptoren sowie die Toll-ähnlichen Rezeptoren [109]. Die Familie der Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) ist die in Säugetieren am besten charakterisierte Klasse der PRR. Die genaue Anzahl der Gene variiert zwischen den Arten; es ist jedoch wahrscheinlich, dass in den meisten Säugetieren 10–15 TLR vorkommen. Einige TLR werden an der Zelloberfläche (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6), andere auf den Membranen der Endozytose-Vesikel oder anderer intrazellulärer Organellen (TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9) exprimiert. TLR bestehen aus einem extrazellulären Abschnitt mit mehreren Leucin-reichen Sequenzen, die an der Bindung der Liganden beteiligt sind, einer kurzen Transmembranregion und einer cytoplasmatischen Toll/Interleukin-1 Rezeptor-domäne (TIR), die mit Adaptormolekülen interagiert. Als Adaptormoleküle fungieren MyD88 (*engl.: Myeloid Differentiation Primary-Response Protein 88*), TIR-Domäne enthaltende Adaptorproteine (TIRAP), TIR-Domäne enthaltende Interferon- β induzierende Adaptorproteine (TRIF) and TRIF-verwandte Adaptormoleküle (TRAM). In Bezug auf das Adaptorprotein MyD88 gibt es MyD88 abhängige und MyD88 unabhängige Signalwege. Die meisten TLR leiten ihre Signale in einer MyD88 abhängigen Weise weiter, mit Ausnahme von TLR3, dessen Signale über einen TRIF-abhängigen Weg laufen. TLR4 nutzt beide

Signalwege. Der weiterführende Weg der Signaltransduktion schließt verschiedene Proteinkinasen ein und endet in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 sind hauptsächlich in die Erkennung von bakteriellen Produkten, deren Detektion eine strenge Diskriminierung von „selbst und nicht selbst“ erfordert, spezialisiert. Diese beinhalten unter anderem Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien (TLR4), bakterielle Lipoproteine sowie Lipopeptide (TLR2 und 6), Peptidoglykan und andere Bestandteile grampositiver Bakterien (TLR2) und Flagellin (TLR5). Im Gegensatz dazu detektieren die Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 Nukleinsäuren, die nicht nur bakterieller sondern auch viraler Herkunft sind. Beispiele dafür sind virale doppelsträngige RNA (TLR3), virale einzelsträngige RNA (TLR7 und 8) und bakterielle unmethylierte CpG-Dinukleotide enthaltende DNA (TLR9) [104]. Es sind auch synthetische Agonisten entwickelt worden, die TLR stimulieren können, wie Imiquimod und Resiquimod (TLR7), Derivate des Makrophagen-aktivierenden Lipopeptides-2 (MALP-2) aus Mycoplasmen (TLR2/6) und CpG-ODN (TLR9) [1,83].

1.2.2 Signaltransduktion und -wirkung nach Interaktion von TLR9 und CpG-ODN

Mit TLR9 wurde der spezifische TLR entdeckt, den das Immunsystem der Vertebraten hervorgebracht hat, um die unmethylierte bakterielle DNA von eigener DNA, in der die meisten CpG-Dinukleotide methyliert sind, zu unterscheiden [38]. Der Rezeptor befindet sich in Endozytose-Vesikeln [75]. Appliziertes CpG-ODN wird nach einer schnellen Internalisierung, in die Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3Ks) involviert sind, in diese Vesikel aufgenommen. Die Interaktion zwischen TLR9 und CpG-ODN führt zum Anschwellen und der Ansäuerung der Endosomen sowie der Erzeugung von Sauerstoffradikalen [31,130]. Durch die Bindung von CpG-ODN an TLR9 wird das Adaptorprotein MyD88 rekrutiert, welches sich an die cytoplasmatische TIR-Domäne des TLRs anlagert (Abb.1.2). Daraufhin kann sich die IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) binden, die sich nach Phosphorylierung von MyD88 abspaltet und den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) aktiviert. Von TRAF 6 ausgehend wird abhängig vom weiterführenden Signaltransduktionsweg die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Aktivatorprotein 1 (AP-1), Nuklearfaktor κ B (NF κ B) und anderer ausgelöst. Diese Transkriptionsfaktoren regulieren nach Translokation in den Nukleus direkt die Expression der Cytokin- und Chemokingene [32,79].

Die konstitutive Expression von TLR9 in humanen Zellen ist begrenzt. Unter den ruhenden Immunzellen wird der Rezeptor hauptsächlich von B-Zellen und plasmazytoiden DC (pDC)

exprimiert [105]. Diese reagieren auf die Stimulation mit CpG-ODN direkt mit der Freisetzung von IL-10, Typ-I-Interferonen (IFN α und IFN β) und IL-12. Infolge dieser Signale kommt es indirekt zur Maturation, Differenzierung und Proliferation von NK-Zellen, T-Zellen und Monozyten und Makrophagen. Diese Zellen erzeugen ein proinflammatorisches und Th1-basiertes Immunmilieu durch die Sekretion von IL-1, IL-6, IL-18 und TNF sowie IFN γ und IL-12 [66,100]. Die späteren Effekte schließen auch die Induktion von kostimulatorischen Molekülen, den Wechsel des Immunglobulin-Isotyps in B-Zellen und die Aktivierung einer Kaskade von zellulären Antworten, die die adaptive Immunantwort fördern, mit ein.

In Mäusen exprimieren B-Zellen, Monozyten und wahrscheinlich alle Subtypen der DC TLR9. Die Expression dieses Rezeptors ist auf den DC in den sekundären lymphoiden Organen, die wahrscheinlich aus dem Blut dorthin gelangen, gut charakterisiert. Auf den peripheren DC in den Geweben ist die Expression unbekannt [46]. Unmethylierte CpG-Motive in bakterieller DNA oder CpG-ODN aktivieren direkt murine B-Zellen [70], Makrophagen [98] und DC [51,96], jedoch keine T-Zellen und wahrscheinlich nicht NK-Zellen [120].

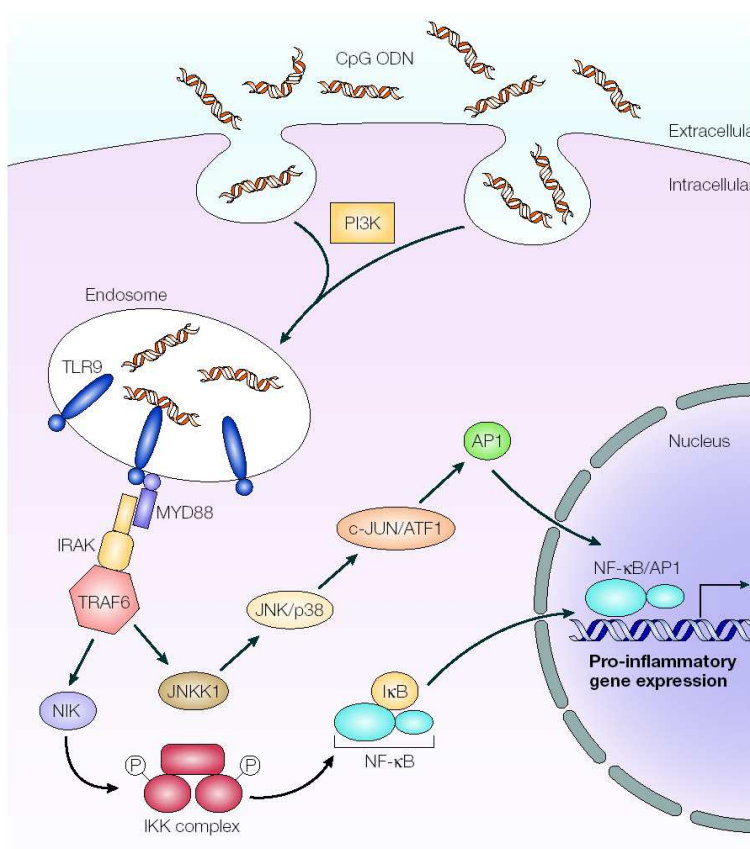


Abb.1.2 Aktivierung von NF κ B nach Interaktion von CpG-ODN und TLR9.

Die internalisierten CpG-ODN interagieren im Endosomen mit TLR9. Die daraufhin aktivierte Signalkaskade über das Adaptorprotein MyD88, IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) und den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) kulminiert, nach Aktivierung der Mitogen-aktivierten - Protein - Kinase (MAPK) - Kaskade und des NF κ B - Inhibitor - Komplexes (IKK), in der Hochregulierung der Transkriptionsfaktoren Aktivatorprotein 1 (AP1) und Nuklearfaktor κ B (NF κ B). (Bildquelle: Klinman, *Nat.Immunol. Rev.*2004)

1.2.3 Molekülstruktur und Aktivität von CpG-ODN

Die immunstimulatorische Aktivität von synthetischen CpG-ODN, die zur Simulation der Wirkung unmethylierte CpG-Motive enthaltender bakterieller DNA hergestellt werden, wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Die Aktivierung von TLR9 ist abhängig von der Natur des Zucker-Phosphat-Gerüsts der DNA, der Sekundärstruktur der DNA, der negativen Ladung der Phosphate, die innerhalb und angrenzend an die CpG-Dinukleotide liegen sowie den die CpG-Motive flankierenden Sequenzen [1]. In nativer DNA besteht das Zucker-Phosphat-Gerüst aus Phosphodiesterbindungen. Diese werden *in vivo* sehr schnell durch die ubiquitären Nukleasen abgebaut. Um die Oligonukleotide weniger anfällig für die Degradation durch die Nukleasen zu machen, wird das Zucker-Phosphat-Gerüst modifiziert. In den Phosphodiesterbindungen wird ein nicht an der Bindung beteiligtes Sauerstoffatom durch Schwefel substituiert [69]. Die daraus resultierenden Phosphorthioatbindungen verbessern die Stabilität der ODN, was sich in der Erhöhung der Halbwertszeit *in vivo* von einigen Minuten auf ungefähr zwei Tage widerspiegelt (Abb.1.3A).

Es gibt drei strukturell verschiedene Klassen von synthetischen CpG-ODN. CpG-ODN der A-Klasse (auch CpG-ODN vom D-Typ) sind durch eine zentrale palindromische Sequenz, die das CpG-Motiv enthält und der Phosphodiesterbindungen zugrunde liegen, sowie einen Poly-G-Schwanz am 3'-Ende mit Phosphorthioatrückrad, charakterisiert. Sie induzieren in pDC eine starke IFN α -Produktion, wodurch indirekt die nachfolgende Maturierung der APC gefördert wird. Das Zucker-Phosphat-Gerüst der CpG-ODN der B-Klasse (auch K-Typ) ist vollständig aus Phosphorthioatbindungen aufgebaut und enthält ein oder mehrere CpG-Dinukleotide. Sie lösen die Differenzierung von APC aus und aktivieren B-Zellen zur Proliferation und Sekretion von IL-6, stimulieren jedoch nur schwach die Sekretion von IFN α . CpG-ODN der C-Klasse (C-Typ) kombinieren die Eigenschaften der CpG-ODN der Klassen A und B. Ihr Zucker-Phosphat-Gerüst besteht aus Phosphorthioatbindungen und das CpG-Motiv liegt in einer zentralen palindromischen Sequenz. Diese CpG-ODN induzieren eine starke IFN α -Produktion in pDC und stimulieren B-Zellen [65].

Die Erkennung von CpG-ODN erfordert in humanen Zellen im Vergleich zu murinen Zellen unterschiedliche die CpG-Motive flankierende Sequenzen. Daher können die präzisen Sequenzmotive, die optimal sind, um die murinen Immunzellen zu stimulieren, von den für humane Anwendungen optimalen abweichen. Die zur Untersuchung des therapeutischen Potentials von CpG-ODN an Mäusen durchgeführten Studien müssen daher im Anschluss hinsichtlich ihrer humanen Wirkung validiert werden.

Für die vorliegende Arbeit wurde das synthetische CpG-ODN 1668, ein CpG-ODN der B-Klasse, verwendet (die im folgenden verwendete Bezeichnung CpG bezieht sich ausschließlich auf dieses CpG-ODN). CpG enthält ein CpG-Motiv, das in die für murine Zellen optimalen flankierenden Sequenzen, die am 5'-Ende aus zwei Purinen und am 3'-Ende aus zwei Pyrimidinen besteht [66,70], eingebettet ist (Abb.1.3B).

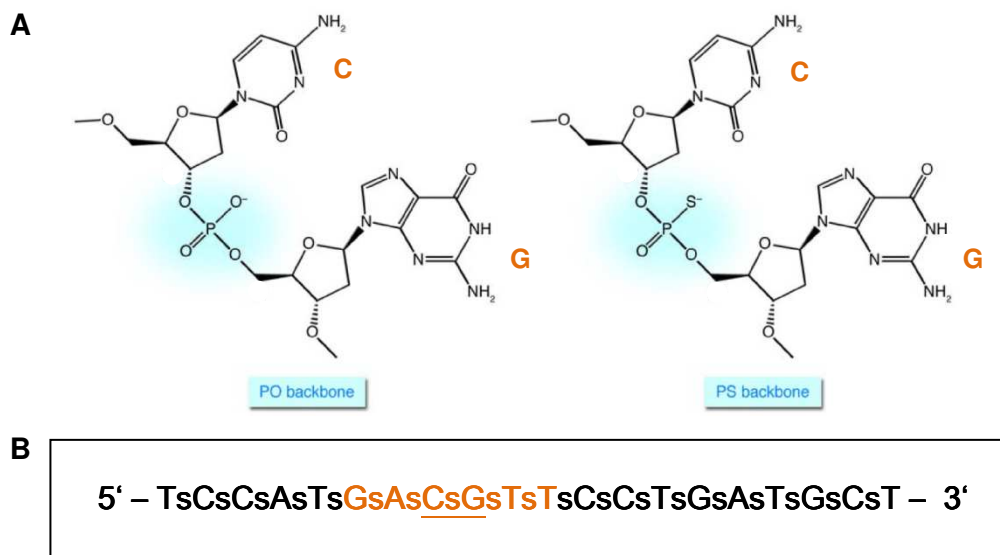


Abb.1.3 Das Zucker-Phosphat-Gerüst und die Nukleotidsequenz von CpG-ODN 1668 (CpG). A) Die Phosphodiesterbindungen im Zucker-Phosphat-Gerüst der nativen DNA wurden durch Substitution eines nicht an der Bindung beteiligten Sauerstoffatoms mit Schwefel modifiziert. Durch diese Veränderung wurde die Stabilität des Oligonukleotids in vivo verbessert. Gezeigt ist das CpG-Motiv. C=Cytosin, G= Guanin. (Bildquelle: Krieg, *JCI* 2007) B) Die 20 Nukleotide umfassende Sequenz von CpG-ODN 1668 (CpG) enthält ein immunstimulatorisches CpG-Motiv, das von zwei Purinen am 5'-Ende und zwei Pyrimidinen am 3'-Ende flankiert wird. (Quelle: TIB MolBiol, Berlin)

1.3 Dendritische Zellen

DC sind aus dem Knochenmark abstammende, spärlich verteilte, migratorische Leukozyten, die in allen Geweben des Körpers zu finden sind. Sie sind darauf spezialisiert, Antigen aufzunehmen, dieses zu prozessieren und in die drainierenden Lymphknoten (LK) zu transportieren sowie das Antigen naiven T-Zellen zu präsentieren. Die in den nicht lymphatischen Geweben vorliegenden unreifen DC werden durch die Antigenaufnahme aktiviert, wodurch sie das Expressionsprofil ihrer Moleküle ändern. Neben Molekülen, die die Migration initiieren, regulieren sie kostimulatorische Moleküle herauf, die für eine effektive Interaktion der beim Eintritt in die LK maturierten DC mit den T-Zellen erforderlich sind.

Lymphoides Gewebe, wie beispielsweise die Milz, beherbergt quieszente DC, die zu einem gewissen Grad maturiert sind, jedoch noch einiges Potential zum Aufnehmen und Prozessieren von Antigenen besitzen. Während durch die DC in der Milz das Blut überwacht wird, sind die in die LK migrierenden DC für das Monitoring des lokalen peripheren Gewebes verantwortlich.

DC regen die T-Zellen nicht nur zur Proliferation an, sie können dabei auch deren nachfolgende Entwicklung beeinflussen. Durch die Signalwirkung der sekretierten Cytokine, deren Expression abhängig ist von der Natur des aufgenommenen Antigens und dem umgebenden Chemokinmilieu während der DC-Aktivierung, werden Effektorzellen oder regulatorische T-Zellen generiert. Ebenso wird die Polarisierung der T-Helferzellen zum Th1- oder Th2-Typ bestimmt.

1.3.1 Die Subtypen dendritischer Zellen in der Maus

DC sind durch die Expression von CD11c- und MHC-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche charakterisiert. Sie werden in zwei Hauptkategorien eingeteilt, pDC und konventionelle DC (*engl.: conventionell DC*, cDC). Die pDC zeichnen sich durch die Produktion von Typ-I-Interferonen aus, sie exprimieren CD45RA und auf einem niedrigen Level CD11c [84]. Die cDC werden auch oft als myeloide DC (mDC) bezeichnet. Sie können in fünf Populationen unterteilt werden, die sich in zwei große Gruppen untergliedern. Die erste Gruppe bilden die migratorischen DC, die sich aus früheren Vorstufen im peripheren Gewebe entwickeln und über die afferenten Lymphwege in die drainierenden LK wandern. Dort repräsentieren sie ungefähr 50% der DC. Weil der afferente Lymphfluss nicht die Milz und den Thymus erreicht, sind migratorische DC in diesen Organen größtenteils abwesend. In den subkutanen LK wurden zwei Subtypen der migratorischen DC beschrieben, die interstitiellen DC, welche in der Haut als dermale DC bezeichnet werden, und die Langerhanszellen (*engl.: Langerhans cells*, LC). In anderen LK sind diese DC nicht zu finden, dagegen enthalten jene eigene Subtypen interstitieller DC aus den drainierten Organen, die den dermalen DC ähnlich sind. Die in den lymphoiden Organen residierenden aus dem Blut kommenden DC sind die zweite Gruppe cDC, die die andere Hälfte der DC in den LK und alle DC in der Milz und im Thymus darstellen. Sie können in drei Typen, CD4⁺ DC, CD8⁺ DC und CD4⁻ CD8⁻ DC unterteilt werden. Zur differenzierten Abgrenzung der Subtypen der cDC sind weitere Marker, wie CD205, CD11b, CD24, das auf LC stark exprimierte Langerin und SIRP α , nützlich. Die in den lymphoiden Organen residierenden DC unterscheiden sich von den migratorischen DC durch eine niedrigere Expression von MHC-II- und kostimulatorischen Molekülen an der Oberfläche [36,117].

1.3.2 Pulmonale dendritische Zellen

Die Lunge kann in zwei unterschiedliche Bereiche aufgeteilt werden, die mit mukosalem Gewebe ausgekleideten leitenden Luftwege (Bronchien, Bronchiolen und Alveolarzugänge) und das aus dünnwandigen Alveolen bestehende Lungenparenchym. In den Luftwegen bilden die interstitiellen DC der Lunge ein über das ganze Epithel ausgedehntes Netzwerk, sie werden als mukosale DC bezeichnet (Abb.1.4). Die mukosalen DC können ihre Fortsätze durch das intakte Epithelium bis in das Lumen der Bronchien ausstrecken und somit den Luftweg überwachen. Im Parenchym befinden sich die sogenannten Gewebs-DC ebenso zwischen den Alveolen wie im Alveolarraum [42].

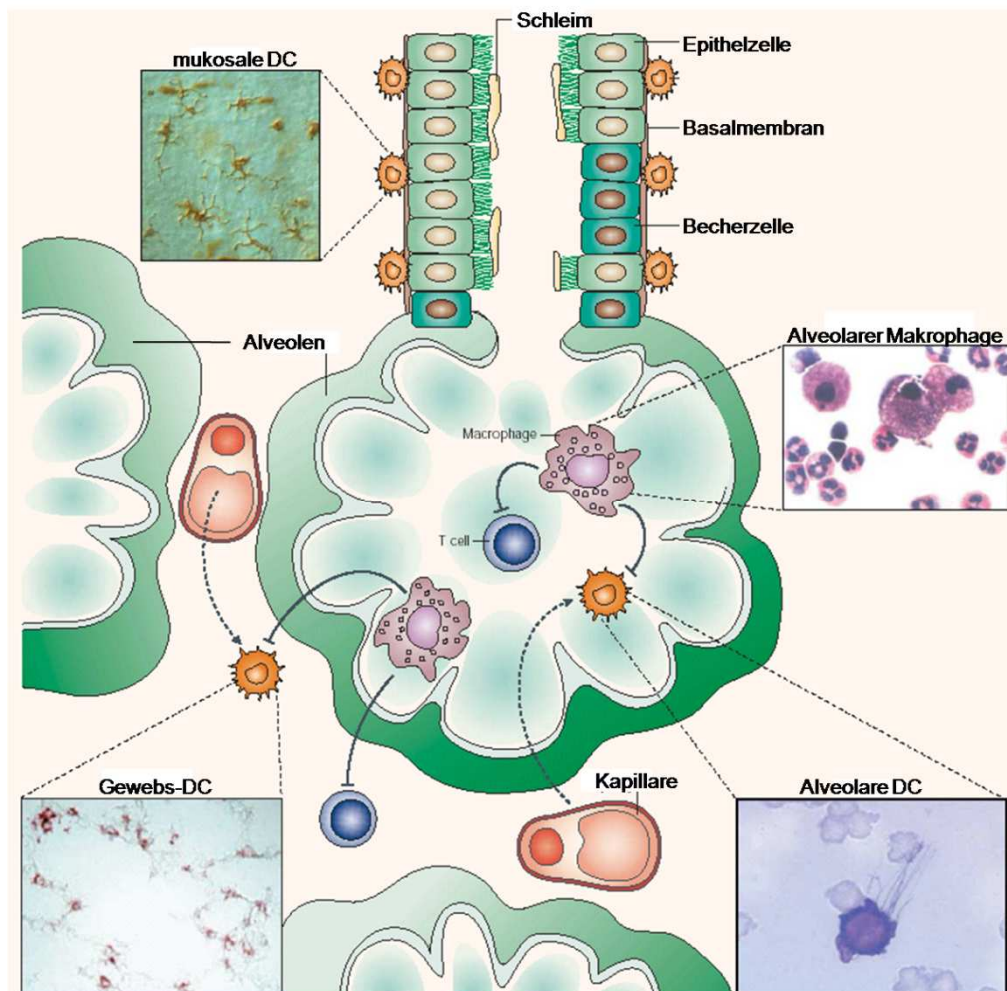


Abb.1.4 DC in der Lunge. Von den Bronchien bis hin zu den Zugängen in die Alveolen bilden die mukosalen DC ein über das ganze Epithel ausgedehntes Netzwerk. Im Lungenparenchym befinden sich Gewebs-DC, die sowohl zwischen den dünnwandigen Alveolen als auch im Alveolarraum zu finden sind. (Bildquelle: Lambrecht, *Nat.Rev.Immunol* 2003)

Die Lungen-DC in der Maus exprimieren auf einem hohen Level MHC-Klasse-II-Moleküle und CD11c. Die in einer großen Anzahl in der Lunge enthaltenen Makrophagen exprimieren ebenfalls CD11c. Sie unterscheiden sich von den DC durch eine starke Autofluoreszenz sowie niedrige MHC-II-Level und sind F4/80⁺, CD2⁺ und CD205⁻. Sowohl die mukosalen DC als auch die Gewebs-DC sind fast einheitlich CD8a^{-low} und CD205⁺; die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 werden von ihnen nur schwach exprimiert. Damit zeigen sie eine gewisse Ähnlichkeit zu DC aus anderen Geweben. Neben den beschriebenen DC-Populationen sind in der Lunge auch pDC zu finden. Die pulmonalen pDC exprimieren nur geringe MHC-II- und CD11c-Level, aber hohe Level von B220, Ly6C und spezifischen Oberflächenmolekülen, wie 120G8 oder mPDCA-1 [123].

Die DC in der Lunge können anhand der Expression der Oberflächenmarker CD11b und CD103 in zwei Subtypen unterteilt werden. Ein Subtyp ist CD11b⁺ und CD103^{-low}, während der andere CD11b⁻ und CD103⁺ ist [101,118]. Wahrscheinlich besitzen sie unterschiedliche Funktionen. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass CD11b⁻/CD103⁺ aber nicht CD11b⁺/CD103^{-low} DC von antigenexponierten Mäusen antigenspezifische Hybridomazellen stimulieren können [55]. CD11b⁻/CD103⁺ DC erinnern in ihrem Phänotyp an LC, da sie Langerin und die sie direkt zur Antigenaufnahme aus dem Bronchiallumen befähigenden Tight-Junction-Proteine Claudin1 und Claudin7 exprimieren [101]. Außerdem wurde für die CD11b⁻/CD103⁺ DC die Fähigkeit, virales Antigen zu den mediastinalen LK zu transportieren, wo es durch die residenten DC an CD8⁺T-Zellen crosspräsentiert wurde, nachgewiesen [7].

Die Lungen-DC sind für die Aufnahme und Prozessierung von Antigen spezialisiert, haben jedoch nicht die Kapazität, effektiv Antigen zu präsentieren. Diese Fähigkeit entwickeln sie normalerweise erst nach der Migration in die drainierenden LK. Unter bestimmten Umständen können sie jedoch *in situ* transient die Aktivität potenter APC entwickeln. So ist im murinen Asthmodell ihre Schlüsselrolle bei der Entstehung der Atemwegsinfektion gezeigt worden [72]. Pulmonale DC spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Sensibilisierung gegenüber inhalieren Antigenen, sie sind auch für die Aufrechterhaltung der Atemwegsinfektion bedeutend [68,74,112].

1.3.3 Antigenaufnahme und Antigenpräsentation

T-Zellen erkennen Antigen nur über die Präsentation der immundominanten Epitope im Kontext mit MHC-Molekülen. Durch ihre hohe Kapazität zur Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigen tragen DC die Voraussetzung für die Aktivierung der T-Zellen. Die Antigenaufnahme erfolgt durch Phagozytose, Pinozytose oder Clathrin-abhängige Rezeptorvermittelte Endozytose. Das aufgenommene proteinogene Antigen wird in Peptidfragmente zerlegt und abhängig vom Abbauweg auf MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Molekülen CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen präsentiert.

Die Degradation der Proteine, durch die die Peptide generiert werden, die auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden, erfolgt im Cytosol in Proteosomen. MHC-II-Moleküle präsentieren Peptide, die in Endosomen durch Kathepsine und andere hydrolytische Enzyme abgebaut werden [127]. Hinsichtlich ihrer Herkunft können Antigene endogen, wenn sie von der DC selbst, oder exogen, wenn sie von anderen Zellen synthetisiert worden, sein. Alle endogenen Polypeptide der DC, die ins Cytosol gelangen, werden kontinuierlich auf MHC-I-Molekülen präsentiert. Das betrifft funktionelle Proteine und defekte ribosomale Produkte ebenso wie normalerweise nicht im Cytosol vorkommende Proteine, wie sekretierte Moleküle oder Membranproteine. Similar werden die endogenen Proteine, die beispielsweise im Rahmen von zelleigener Degradation in die Endosomen transferiert werden, auf ihren eigenen MHC-II-Molekülen präsentiert (Abb.1.5). Endogene virale Antigene, die DC nach Virusinfektionen produzieren, werden auf gleiche Weise in die beiden Antigenpräsentationswege integriert. Exogene Antigene müssen vor der Prozessierung in den entsprechenden Kompartimenten zunächst aufgenommen werden. Durch die Ingestion werden sie direkt den Proteasen in den Endosomen zugänglich gemacht und daraufhin über MHC-II-Moleküle präsentiert. Zusätzlich existiert ein Weg, der Cross-Präsentation genannt wird. Durch diese einzigartige Fähigkeit, die speziell für CD8⁺ DC nachgewiesen wurde, wird das exogene Antigen in den MHC-I-Präsentationsweg überführt [117].

Auf der klassischen Route der MHC-II-Präsentation wird das Antigen nach der Aufnahme in membrangebundene Vesikel eingeschlossen. Diese Endosomen genannten Kompartimente fusionieren mit Lysosomen zu Endolysosomen, in denen die verschiedenen hydrolytischen Enzyme und der vorherrschende niedrige pH-Wert die Degradation des Antigens zu 13-18 Aminosäuren langen Oligopeptiden bedingen. Diese Oligopeptide werden anschließend in einem durch diverse Chaperone gesteuerten komplexen Prozess auf MHC-II-Moleküle geladen: Die aus α - und β -Ketten bestehenden heterodimeren MHC-II-Moleküle sind nach ihrer Synthese im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) mit einer invarianten Kette verbunden, die die α - und β -Ketten zusammenhält und verhindert, dass die von ihnen

gebildete Antigenbindungsfurche mit unangemessenen Peptiden beladen wird. Dieser Trimer-Komplex wandert über das *trans*-Golgi-Netzwerk in die späten Endosomen. Dort wird die invariante Kette auf das kurze CLIP (*engl.: class II-associated invariant chain peptide*) - Fragment getrimmt. CLIP hält die Bindungsfurche besetzt bis es, durch ein HLA-DM-Molekül katalysiert, von einem Antigen-abstammigen Peptid verdrängt wird. Nach der Bindung des Peptids wird der MHC-II-Peptid-Komplex zur Plasmamembran transportiert und spezifischen CD4⁺ T-Zellen präsentiert [4].

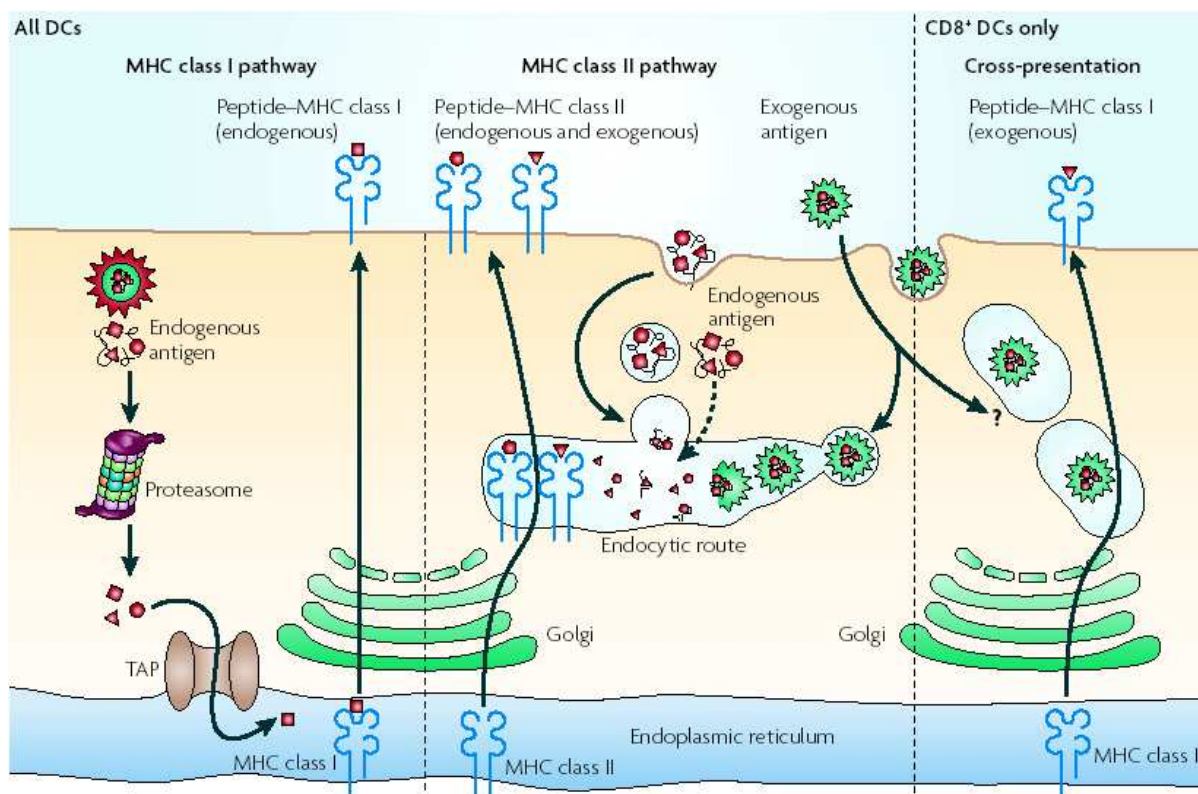


Abb.1.5 Wege der Antigenpräsentation in DC. Über den MHC-Klasse-II-Weg werden Peptide präsentiert, die in Endosomen getrimmt, dort auf MHC-II-Moleküle geladen und zur Zellmembran transportiert werden. In den Endosomen können sowohl aufgenommene exogene als auch endogene Proteine abgebaut werden. Auf den MHC-I-Molekülen werden Peptide präsentiert, die von im Cytosol in Proteosomen degradierten Proteinen stammen. Diese Peptide werden mit Hilfe von TAP (*transporter associated with antigen presentation*) ins endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Von dort gelangen sie nach Zusammensetzung des MHC-I-Peptid-Komplexes über den Golgiapparat an die Zelloberfläche. Auf diese Weise werden endogenen Proteine präsentiert, die zelleigener als auch viraler (nach Infektionen) Herkunft sein können. Die Cross-Präsentation ist ein besonderer Weg mit noch unvollständig geklärtem Mechanismus, durch den exogenes Antigen in den MHC-I-Präsentationsweg überführt werden kann. (Bildquelle: Villadangos, *Nat.Rev.Immunol.* 2007)

Der klassische MHC-I-Weg beginnt in den Proteosomen. In den multifunktionalen Protease-Komplexen werden denaturierte, fehlgebildete oder abnormale Proteine, die zuvor ubiquitinyliert wurden, zu Peptiden einer Länge von 8-12 Aminosäuren degradiert. Diese Peptide werden mit Hilfe eines ATP-abhängigen Transporters (*engl.: transporter associated with antigen presentation*, TAP) ins ER transportiert. Das dort vorliegende Heterodimer aus einer MHC-Klasse-I- α -Kette und β 2-Mikroglobulin wird durch die Bindung des Peptids stabilisiert. Der Zusammenbau der MHC-I-Moleküle wird durch die Chaperone Calnexin, Calreticulin, Tapasin und ERp57 kontrolliert. Nur korrekt zusammengesetzte und Peptid-beladene MHC-I-Moleküle werden über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transloziert.

Der Mechanismus der Cross-Präsentation ist noch nicht vollständig aufgeklärt und wird heftig diskutiert [36]. Es ist beschrieben worden, dass Phagosomen mit Vesikeln des ER, die neu synthetisierte MHC-I-Moleküle zusammen mit anderen Komponenten des klassischen MHC-I-Wegs enthalten, fusionieren. Das phagozytierte Antigen wird dann in das angrenzende Cytosol transportiert, wo es in eng assoziierten Proteosomen degradiert wird. Die resultierenden Peptide werden über den TAP-Komplex in das fusionierte Phagosomen zurück transportiert und auf MHC-I-Moleküle geladen. Andere haben gezeigt, dass alle Schritte wie die Translokation des Antigens zurück ins Cytosol, die proteolytische Degradation, der Transport via TAP und das Beladen der MHC-I-Moleküle allein am Phagosomen stattfinden. Zumindest die TAP-Abhängigkeit der Cross-Präsentation ist fest etabliert.

1.3.4 Migration

Die Fähigkeit der DC und ihrer Vorläuferzellen zur Migration durch den Körper ist ein bedeutender Aspekt für die Erfüllung ihrer immunologischen Funktion. Insbesondere zur Induktion einer adaptiven Immunantwort auf fremde Antigene ist die Migration der DC ebenso notwendig, um die DC an den Ort der Infektion im peripheren Gewebe zu rekrutieren, als auch um die aufgenommenen Antigene in die sekundären lymphatischen Organe zu transportieren und dort zu präsentieren.

Die Zirkulation der DC umfasst mehrere diskrete Ereignisse. Zunächst müssen die neu gebildeten DC oder ihre Vorläuferzellen die primären lymphatischen Organe (das Knochenmark oder den Thymus), in denen sie gebildet worden, verlassen und ins Blut übertreten. Durch gewebsspezifische Signale oder proinflammatorische Chemokine werden die zirkulierenden Zellen aus dem Blut ins periphere Gewebe rekrutiert. Aus dem Blut können auch zirkulierende Zellen in die sekundären lymphatischen Organe abgezogen werden, wo die dort residierenden DC kontinuierlich durch Vorläuferzellen ersetzt werden.

Einige bereits funktionell festgelegte DC gelangen auch aus dem peripheren Gewebe über die drainierende Lymphe und das Blut zurück in die primären lymphatischen Organe. Im Gewebe ist die interstitielle Migration der DC erforderlich, um Antigen erreichen und aufnehmen zu können. Aus dem peripheren Gewebe wandern die DC dann über die afferenten Lymphgefäße in die drainierenden LK. Durch die Migration erlangen die DC ebenso die Fähigkeit, mit Lymphozyten und anderen Immunzellen zu interagieren [2].

Der Zugang unreifer DC in peripheres Gewebe und die Navigation innerhalb diesem wird von spezifischen Chemokinrezeptoren und ihren Liganden, wie CCR2-CCL2, CCR5-CCL5 und CCR6-CCL20 gesteuert. Die Vorläuferzellen verschiedener cDC, Ly-6C^{hi}-CX₃CR1^{low}-CCR2^{hi} Monozyten, werden vorzugsweise durch die Interaktion von CCR2 und CCL2 rekrutiert, wogegen die andere Subpopulation der in Makrophagen differenzierenden Ly-6C⁻-CX₃CR1^{hi}-CCR2^{low/-} Monozyten mit dem Transmembranprotein CX₃CL1 im Endothelium interagiert [28]. Für die Rekrutierung von pDC in den Dünndarm wurde die Ligandierung des Chemokinrezeptors CCR9 mit dem in der Darmwand generierten Chemokin CCL25 als erforderlich beschrieben [122]. Der Übertritt der DC und ihrer Vorläuferzellen über eine Endothelzellschicht vom Blut ins Gewebe verläuft, ähnlich wie die Extravasation anderer Leukozyten, in einer Folge von Anhaften, Rollen, Aktivierung, fester Adhäsion und Transmigration. Das Anhaften und Rollen wird primär über Mitglieder der Selektinfamilie und gelegentlich durch α 4-Integrine vermittelt. Die Aktivierung der reversibel an der Oberfläche der Endothelzellen gebundenen Zellen erfolgt durch aktivierte Integrine, heterodimeren aus je einer α - und β -Kette bestehenden Molekülen, die durch Bindung ihrer Liganden, Mitgliedern der Immunglobulinsuperfamilie, die Adhäsion der rollenden Zellen auslösen. Diese Signalkomplexe beinhalten die Integrine LFA-1 (α L β 2), VLA-4 (α 4 β 1), Mac-1 (α M β 2) und α 4 β 7 mit den Liganden ICAM-1 (bindet LFA-1 und Mac-1), ICAM-2 (bindet LFA-1), VCAM-1 (bindet VLA-4 und schwach α 4 β 7) und MAdCAM-1 (bindet α 4 β 7). Die in die Adhäsion involvierten Moleküle sind abhängig vom DC-Subtyp und dem Zielgewebe, wodurch eine spezifische und selektive Rekrutierung stattfindet [97].

Im Rahmen der interstitiellen Migration müssen die DC extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen und Fibronectin überwinden, wozu sie proteolytische Enzyme einschließlich membrangebundener und sekretierter Formen von Matrixmetalloproteasen (MMP), insbesondere MMP-2 und MMP-9, hochregulieren. Diese Enzyme benötigen die DC, um sich aus dem Gewebe abzulösen und in die LK wandern zu können. Die interstitielle Migration wird dabei durch Gewebshemmer der Matrixmetalloproteasen (TIMP) kontrolliert, die als endogene Regulatoren der MMP-Aktivität fungieren und die Emigration der DC blockieren können [87].

Wenn die DC nach Antigenaufnahme maturieren, regulieren sie die für die Einwanderung ins Gewebe benötigten Rezeptoren herunter und exprimieren den Chemokinrezeptor CCR7. Die Expression des Rezeptors wird durch proinflammatorische Signale wie IL-1 β und TNF α induziert. CCR7 reagiert auf die Liganden CCL19 und CCL21, die entlang der afferenten Lymphwege sowie im Parakortex und im subkapsulären Sinus der LK lokalisiert sind. Aufgrund der Interaktion dieser Chemokine mit CCR7 erfolgt die gerichtete Wanderung der DC zu den drainierenden LK. Die Wechselwirkung von CCR7 und seiner Liganden ist der am besten untersuchte Signalweg für die Migration der DC zu den LK. Zusätzlich kontrollieren die Moleküle CCR8 und CCL1 den Zugang von DC ins Parenchym der LK [86]. Für die Migration von LC und dermalen DC ist gezeigt worden, dass der Rezeptor CXCR4 und das Chemokin CXCL12 parallel zu dem chemotaktischen Weg über CCR7-CCL21/19 einen unabhängigen und notwendigen Signalweg darstellen [56].

Innerhalb der LK werden die migrierenden DC über den CCR7-CCL21/19-Signalweg tiefer bis in den Kortex geleitet. CCL19 und CCL21 sind am stärksten im Bereich der Endothelzellen der postkapillaren Venen (*engl.: high endothelial venules*, HEV) exprimiert, wodurch ein interstitieller Gradient ausgebildet wird. Während der CCL19-Gradient die DC in die T-Zell-reiche Zone führt, ist ein weiteres Chemokin, CXCL13, für die Kolonisierung der DC in den B-Zellen enthaltenden sekundären Follikeln verantwortlich. CXCL13 bindet, unabhängig von CCR7, an den Chemokinrezeptor CXCR5 [25].

1.4 Hypothese

Die Entstehung Th2-vermittelter allergischer Atemwegsentzündungen ist in verschiedenen Mausmodellen durch die Behandlung mit CpG-ODN supprimiert wurden. Der inhibitorische Effekt konnte nicht auf die Th1-Cytokine IFN γ und IL-12 zurückgeführt werden. Ebenso stellten der Nachweis der Suppression der T-Zellen der durch CpG-ODN induziertenIDO [35] sowie die Beschreibung der Inhibition der Aktivierung der allergenspezifischen Th2-Zellen in der Lunge [39] noch keine hinreichende Erklärung für den Mechanismus dar. Bei der Aktivierung von T-Zellen haben DC als Initiatoren der adaptiven Immunantwort eine besondere Funktion. Ihre Schlüsselrolle wurde auch für die Entwicklung und Persistenz allergischer Atemwegsinfektionen gezeigt. Für die weitere Aufklärung des Mechanismus der inhibitorischen Wirkung von CpG-ODN wäre die Untersuchung des Effekts von CpG-ODN auf die DC daher ein vielversprechender Ansatz.

Im unreifen Status haben DC eine hohe Kapazität zur Endozytose von Antigenen, die sie prozessieren und auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentieren. Ebenso besitzen sie die spezielle Fähigkeit zur Cross-Präsentation des phagozytierten exogenen Antigens über den MHC-Klasse-I-Weg. Während ihrer Maturierung verlieren die DC ihre endozytische Kapazität, wodurch sie kein weiteres Antigen aufnehmen und prozessieren können. Liganden von TLR aktivieren unreife DC und führen dadurch zu Veränderungen im Phänotyp der Zellen. Durch die Exposition mit CpG-ODN werden DC maturiert und sind nicht mehr fähig, erneut Antigen aufzunehmen und dieses zu präsentieren. Das ist für die Antigenpräsentation auf dem klassischen MHC-II-Weg ebenso wie für die Cross-Präsentation von endozytierten Antigenen gezeigt worden [128,132]. Die Verhinderung der Antigenpräsentation nachfolgend verabreichter Antigene als Folge der Aktivierung der DC in der Lunge nach CpG-ODN-Applikation könnte auch die inhibitorische Wirkung von CpG-ODN bei der Entstehung von asthmatischen Reaktionen erklären.

Die inhibierende Wirkung von CpG sollte zunächst in einem klassischen sowie einem Th2-Asthmamodell demonstriert werden. Zur Bestätigung der Hypothese sollten dann die phänotypischen Veränderungen der pulmonalen DC durch die CpG-Behandlung analysiert werden. Daran anschließend war die Fokussierung auf die Antigenpräsentation der DC aus der Lunge und den drainierenden LK vorgesehen. Diese sollte anhand indirekter und direkter Methoden untersucht werden.

2. Ergebnisse

2.1 Reduktion der allergischen Entzündungsreaktion im klassischen Asthmodell durch CpG

Durch die Applikation von CpG kann die Entstehung von allergischen Entzündungen der Atemwege verhindert werden. Zuerst sollte diese These in einem klassischen Asthmodell in C57BL/6-Mäusen (BL6) bestätigt werden. Dazu wurde ein Sensibilisierungsmodell mit OVA und dem Adjuvant Alum verwendet, welches bereits von Kooperationspartnern entwickelt worden war. BL6-Mäuse wurden an Tag 1, 14 und 21 mit OVA und Alum in PBS mittels intraperitonealer Injektion sensibilisiert und an Tag 28 und 29 jeweils 20 min inhalativ mit 1% OVA in PBS provoziert. Den Tieren aus der Behandlungsgruppe wurde einen Tag vor der Provokation CpG intranasal appliziert. Die Tiere der negativen Kontrollgruppe wurden nur mit Alum in PBS sensibilisiert und ebenfalls mit OVA provoziert. Einen Tag nach der zweiten Provokation wurden die Tiere durch eine Überdosis Ketamin in Kombination mit Rompun getötet und ihre Lungen analysiert. In der BAL wurden die Gesamtzellzahlen bestimmt sowie von den Zellen Cytospots angefertigt, anhand derer die Subpopulation differenziert wurden. Von den Lungen wurden nach Fixierung mit Formalin und Einbettung in Parafin Gewebsschnitte angefertigt.

Die Gesamtzellzahlen in der BAL waren in den CpG-behandelten BL6-Mäusen gegenüber den unbehandelten OVA-sensibilisierten und -provozierten Mäusen signifikant reduziert (Abb.2.1A). Ebenso war wenig Influx von Zellen in das Lungengewebe der CpG-behandelten Tiere zu beobachten, während sich im Gewebe der positiven Kontrolltiere eine deutliche Inflammation sowohl peribronchial als auch perivaskulär zeigte (Abb.2.1C).

Die Eosinophilie ist ein Hauptmerkmal der allergischen Entzündungsreaktion. Deshalb wird speziell die Subpopulation der eosinophilen Granulozyten als Parameter zur Beurteilung einer allergischen Reaktion herangezogen [11,64,93,94]. Die Anzahl der Eosinophilen in der BAL der CpG-behandelten Tiere konnte hier um über 90% gegenüber den Tieren der positiven Kontrollgruppe verringert werden (Abb.2.1B). Die Zellzahlen der Makrophagen, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten wurden, wie bereits in der Literatur gezeigt [11], durch die Behandlung nicht wesentlich verändert.

Mit den dargestellten Ergebnissen wurde bestätigt, dass CpG in dem hier angewandten klassischen Asthmodell die allergische Entzündungsreaktion inhibiert.

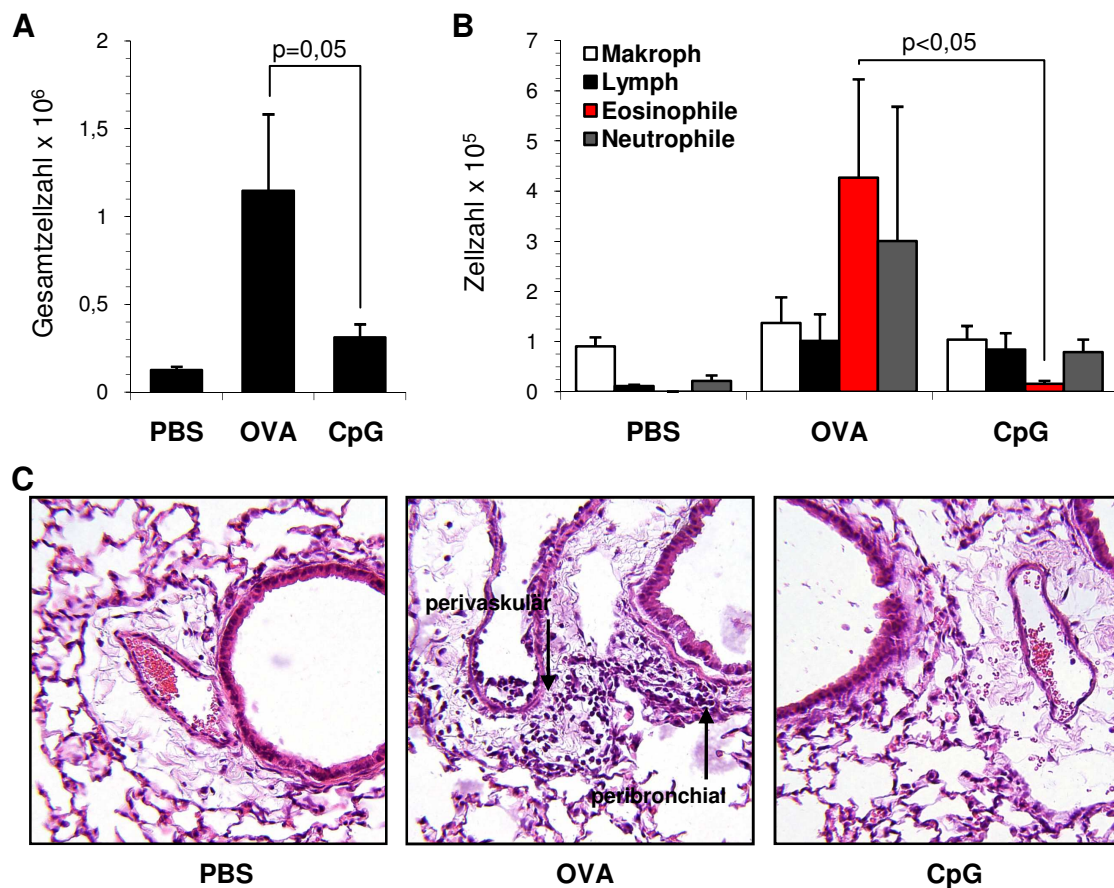


Abb.2.1 Inhibierung der allergischen Entzündungsreaktion im klassischen Asthmamodell durch CpG. BL6-Mäuse wurden an Tag 1, 14 und 21 mit 10 µg OVA, die an 1,5 mg Alum adsorbiert waren, i.p. sensibilisiert und an Tag 28 und 29 mit 1% OVA in PBS inhalativ provoziert (OVA). Einen Tag vor der ersten Provokation wurde den Mäusen in der Behandlungsgruppe CpG i.n. appliziert (CpG). Die Tiere der negativen Kontrollgruppe (PBS) waren mit Alum in PBS sensibilisiert worden. 24 h nach der zweiten Provokation wurden die Gesamtzellzahlen (A) sowie die Subpopulation der Makrophagen, Lymphozyten, Eosinophilen und Neutrophilen (B) in der BAL wurden analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von gepoolten Daten aus drei Experimenten mit 3-4 Tieren pro Gruppe. (C) HE-Färbung repräsentativer Gewebsschnitte der Lungen in der Vergrößerung 1:160.

2.2 Th2-Asthmamodell

Die inhibitorische Wirkung von CpG sollte in einem weiteren Asthmamodell bestätigt werden. Im Th2-Asthmamodell wird die Phase der Sensibilisierung mit OVA/Alum durch den adoptiven Transfer von zu Th2-Zellen differenzierten CD4⁺ T-Zellen ersetzt.

Dieses Modell erfordert zum einen eine kürzere experimentelle Dauer, vor allem aber kann damit spezifisch die Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen im Kontext von asthmatischen Entzündungsreaktionen und dabei die Rolle von DC untersucht werden.

2.2.1 Generierung von Th2-Zellen

Für die Etablierung des Th2-Asthmamodells mussten zunächst Th2-Zellen aus naiven OVA₃₂₃₋₃₃₉-spezifischen CD4⁺ T-Zellen generiert werden. In Anlehnung an die Literatur [19] wurden dafür DO11.10 mit APC in Gegenwart von IL-2, IL-4, anti IFN γ und OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid kokultiviert. Die DO11.10 wurden aus den LK transgener Mäuse gewonnen, die den OVA₃₂₃₋₃₃₉-spezifischen T-Zell-Antigenrezeptor (*engl.: T-cell receptor, TCR*) auf CD4⁺ T-Zellen exprimieren. Zur Antigenpräsentation wurden DC verwendet, die aus den Milzen von BALB/c-Mäusen isoliert wurden. Nach vier Tagen Kokultivierung lagen die OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid spezifischen DO11.10 in einer Reinheit von 85% vor (Abb.2.2I). Ihre Funktionalität wurde in einem IL-4-ELISpot-Assay überprüft, wobei die kultivierten DO11.10 mit DC und OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid restimuliert wurden. Wie aus Abb.2.2II ersichtlich, wiesen die generierten T-Zellen eine hohe IL-4-Expression auf (E), die auch schon durch Kultivierung ohne Restimulation spontan erfolgte (D). Damit war gezeigt, dass sich die kultivierten DO11.10 zu OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid spezifischen Th2-Zellen spezialisiert hatten.

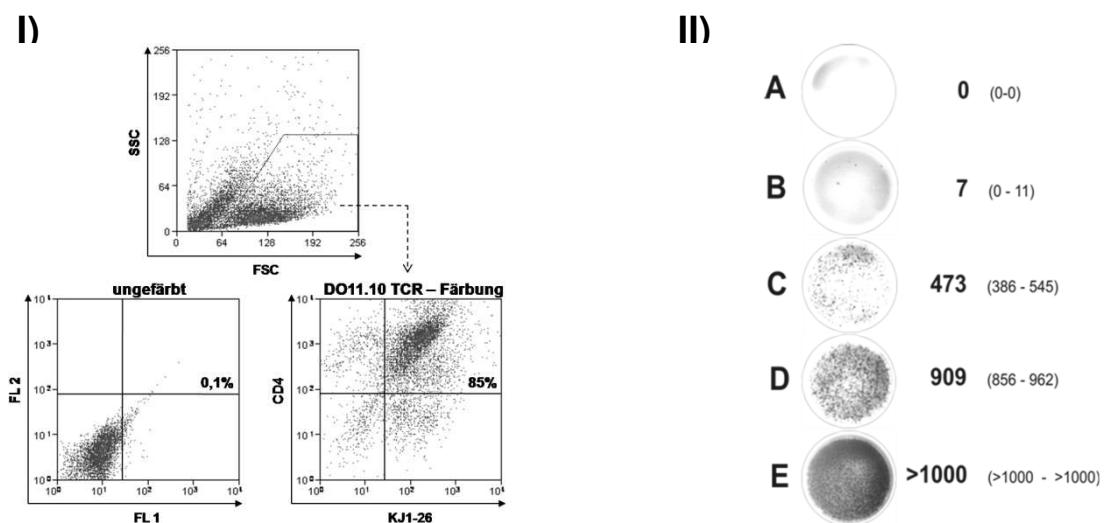


Abb.2.2 Generierung von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid spezifischen Th2-Zellen aus DO11.10. Milz-DC von BALB/c-Mäusen und DO11.10 wurden im Verhältnis 1:5 in IL-2, IL-4, anti IFN γ und OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid enthaltendem Kompletmedium vier Tage kultiviert. I) Die kultivierten T-Zellen waren 85% doppelt positiv für CD4 und den OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid spezifischen DO11.10-TCR (Klon KJ1-26). II) Je 250.000 dieser T-Zellen wurden mit bzw. ohne Stimulanzen 22 h kultiviert und IL-4 exprimierende Zellen als Spots detektiert. Medium (A), native DO11.10 (B) und mit DC und OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid stimulierte native DO11.10 (C) wurden als Kontrollen mitgeführt. Die kokultivierten DO11.10 zeigten sowohl mit DC/OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid-Stimulation (E) als auch spontan (D) eine starke IL-4-Expression.

2.2.2 Etablierung des Th2-Asthmamodells

Das Th2-Asthmamodell wurde an BALB/c-Mäusen eingesetzt, da dieser Stamm sich wegen seiner Sensitivität gegenüber allergischen Reaktion am besten eignet und dazu Vergleichsdaten in der Literatur zu finden sind [18,19,22]. Zur Induktion der allergischen Entzündungsreaktion in den Atemwegen wurden den Mäusen $4-5 \times 10^6$ aus DO11.10 generierte Th2-Zellen intravenös transferiert und die Tiere vom nächsten Tag an alle 24 h inhalativ OVA ausgesetzt. Die OVA-Exposition wurde von anderen Arbeitsgruppen bis zu 10mal durchgeführt, um über 50-70% Eosinophilie zu induzieren. Hier waren nach drei Antigenexpositionen über 30 % der Zellen in der BAL eosinophile Granulozyten, womit eine ausreichend große Subpopulation erzielt wurde, die als Parameter für die Verdeutlichung der Unterschiede durch die zu untersuchende CpG-Behandlung dienen konnte.

Ein limitierender Faktor in der Durchführung des Th2-Asthmamodells war die Anzahl zu transferierender Th2-Zellen, da erhebliche Mengen dieser Zellen generiert werden mussten, um mindestens 10-15 Tiere in einem Experiment sensibilisieren zu können. Deshalb wurde ausgetestet, wie weit sich die Anzahl der zu transferierenden Th2-Zellen erniedrigen ließe, um noch einen eindeutig erkennbaren inflammatorischen Zellinflux in die Lungen zu erzielen und 20% Eosinophile zu induzieren.

Die Gesamtzahl der Zellen in der BAL korrelierte wider erwarten nicht mit der Anzahl der transferierten Th2-Zellen (Abb.2.3A). Da sich dieser Trend jedoch bei den prozentualen Anteilen der Eosinophilen in der BAL zeigte, ergaben sich ähnliche absolute Zellzahlen für die Eosinophilen, wenn vier, drei oder zwei Millionen Th2-Zellen transferiert wurden (Abb.2.3B). Anhand dieser Ergebnisse konnte gesagt werden, dass im hier verwendeten Asthmamodell der Transfer von 2×10^6 Th2-Zellen ausreichend war, um eine allergische Entzündungsreaktion zu induzieren.

Das Asthmamodell wurde auch in BL6-Mäusen untersucht, die aus OVA₃₂₃₋₃₃₉-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (OT-II) aus dem kongenetischen Mausstamm generierte Th2-Zellen transferiert bekamen. Die Tiere wurden fünfmal dem Allergen exponiert, da der Stamm stärker resistent gegenüber der Induktion asthmaähnlicher Entzündungen ist. Hier wurden die allergischen Entzündungsreaktionen in den Lungen der Tiere nur nach dem Transfer von 4 und 2×10^6 Th2-Zellen miteinander verglichen. Dabei wurden für beide Bedingungen annähernd gleiche Ergebnisse in der Analyse der BAL gefunden. Die Gesamtzellzahl betrug zwischen $1,0-1,8 \times 10^6$ und die Zahl der Eosinophilen 250.000-600.000. Auch in BL6-Mäusen waren somit 2×10^6 Th2-Zellen zur Induktion einer allergische Entzündungsreaktion ausreichend.

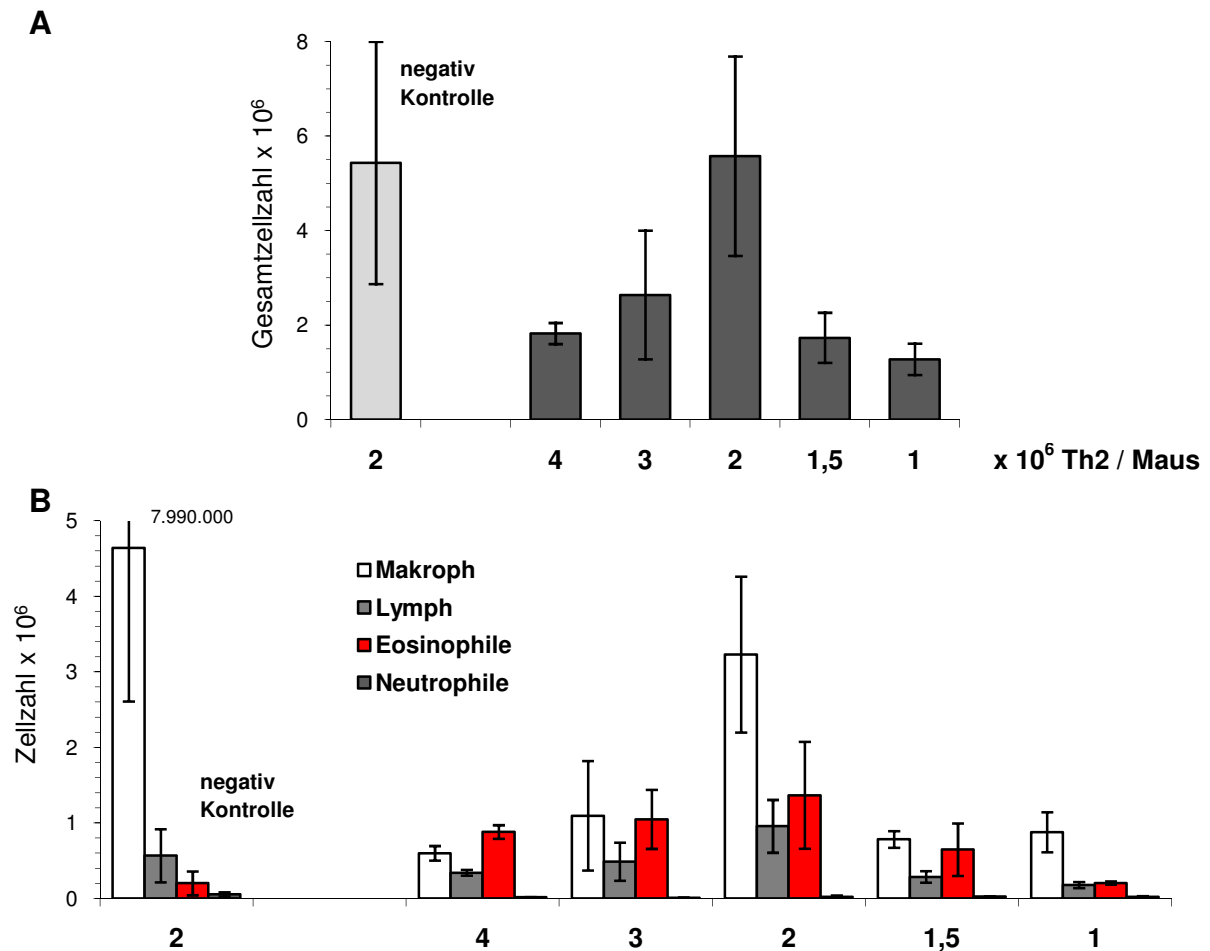


Abb.2.3 Titration der zu transferierenden Th2-Zellen. BALB/c-Mäusen wurden $1-4 \times 10^6$ Th2-Zellen, wie angezeigt, i.v. transferiert. An den drei darauffolgenden Tagen wurden die Tiere je 20 min inhalativ mit OVA, die der negativen Kontrollgruppe mit PBS, provoziert. Einen Tag nach der letzten Provokation wurden die Tiere getötet und die Gesamtzellzahlen (A) sowie die Subpopulation (B) in der BAL analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 2 Tieren pro Gruppe.

Bei der Aktivierung der Th2-Zellen im Asthmodell zur Induktion der allergischen Entzündungsreaktion spielen die DC eine entscheidende Rolle. Sie sollten auch der Gegenstand später folgender Experimente sein. Deshalb wurde in einem Versuch getestet, ob die artifiziell in den Körper der Maus gebrachten Th2-Zellen einen Einfluss auf die Funktion der DC *in vivo* haben. BL6-Mäusen wurden 4×10^6 Th2-Zellen transferiert, 24 h später wurden die DC aus den Milzen der Tiere isoliert und in einem Proliferationsassay auf ihre Funktion, OVA₃₅₇₋₃₆₄-spezifische CD8⁺ T-Zellen (OT-I) zu stimulieren, mit den DC aus Milzen von unbehandelten Tieren vom Wildtyp (wt-Tiere) verglichen.

Wie aus der Literatur bekannt ist [92], prozessieren und präsentieren CD8⁺ DC besser Antigen an OT-I-Zellen als CD8⁻ DC. Die DC aus Th2 behandelten BL6-Mäusen unterschieden sich in der Prozessierung und Präsentation von OVA-Protein nicht von den

DC aus Wildtyp-Mäusen (wt-Mäuse). Auch quantitativ regten sie ähnliche Mengen OT-I zur Proliferation an (Abb.2.4). Nach der Beladung mit OVA₃₅₇₋₃₆₄-Peptid präsentierten beide DC-Subpopulationen, ob aus Th2 behandelten oder unbehandelten Mäusen, dieses gleichermaßen an OT-I, womit die Vitalität der DC bewiesen wurde. Daraus war zu schließen, dass durch die Präsenz der Th2-Zellen im Körper der Maus die Funktionalität der DC nicht eingeschränkt wird.

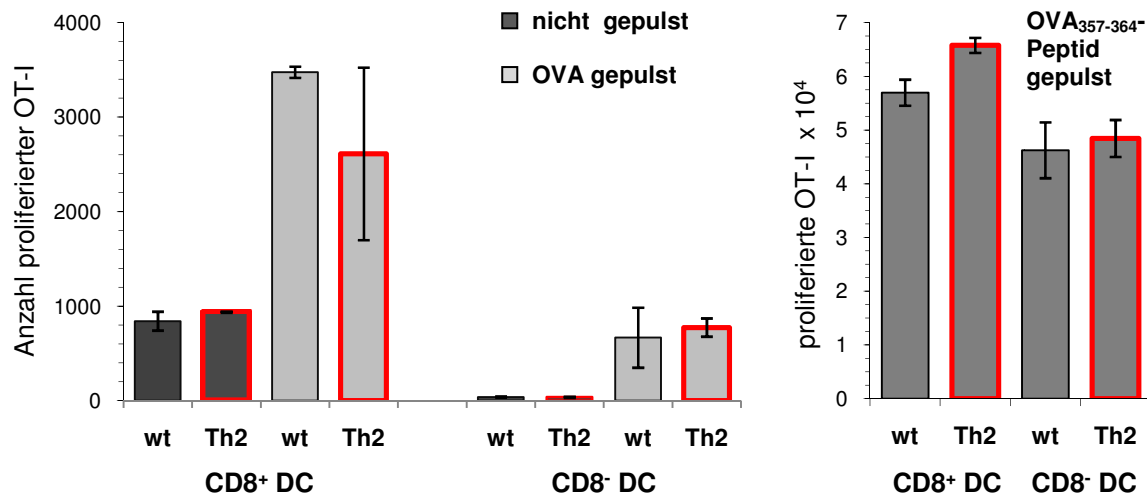


Abb.2.4 Die transferierten Th2 haben keinen Einfluss auf die Funktion der endogenen DC. BL6-Mäusen wurden 4×10^6 Th2-Zellen transferiert (Th2) oder sie wurden unbehandelt gelassen (Wildtyp, wt). Nach 24 h wurden die DC aus den Milzen der Tiere isoliert und in CD8⁺ und CD8⁻ CD11c⁺-DC sortiert. Je 10.000 DC wurden 45 min mit OVA-Protein oder OVA₃₅₇₋₃₆₄-Peptid gepulst und anschließend 60 h mit CFSE gelabelten OT-I kokultiviert. Die Anzahlen proliferierter OT-I wurden als CD8⁺CFSE^{low}T-Zellen durchflusszytometrisch gemessen. In der Graphik sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen aus einem Experiment gezeigt.

2.2.3 Reduktion der allergischen Entzündungsreaktion durch CpG im Th2-Asthmamodell

Der Effekt von CpG auf die Entwicklung einer allergischen Entzündungsreaktion in den Atemwegen nach Transfer von Th2-Zellen wurde sowohl in BALB/c- als auch BL6-Mäusen untersucht. In beiden Modellen wurden den Mäusen aller Gruppen Th2-Zellen transferiert. Die Tiere der positiven Kontrollgruppen (OVA) und der Behandlungsgruppen (CpG) wurden an den darauffolgenden Tagen mit OVA inhalativ provoziert, die Tiere der negativen Kontrollgruppen (PBS) wurden nur PBS exponiert. Die intranasale Applikation von CpG erfolgte direkt vor dem Th2-Transfer. Einen Tag nach der letzten Allergenexposition wurden die Tiere getötet und die BAL sowie die Lungenhistologie analysiert.

Den BALB/c-Mäusen wurden 2×10^6 Th2-Zellen injiziert, gefolgt von drei Allergenprovokationen. Obwohl in den Tieren der OVA-Gruppe weniger als 1/10 der Eosinophilen induziert werden konnten als in den Vorversuchen (siehe Abb.2.3B), reichte die Zellzahl aus, um zu zeigen, dass CpG die Eosinophilie signifikant reduzierte (Abb.2.5B). Ebenfalls signifikant erniedrigt wurden die Anzahl der Neutrophilen und die Gesamtzellzahl (Abb.2.5A und B). In der Lungenhistologie zeigte sich ein vermehrter Zellinflux ins Gewebe der OVA- gegenüber den PBS-exponierten Tieren, der durch die CpG-Behandlung verhindert wurde (Abb.2.5C).

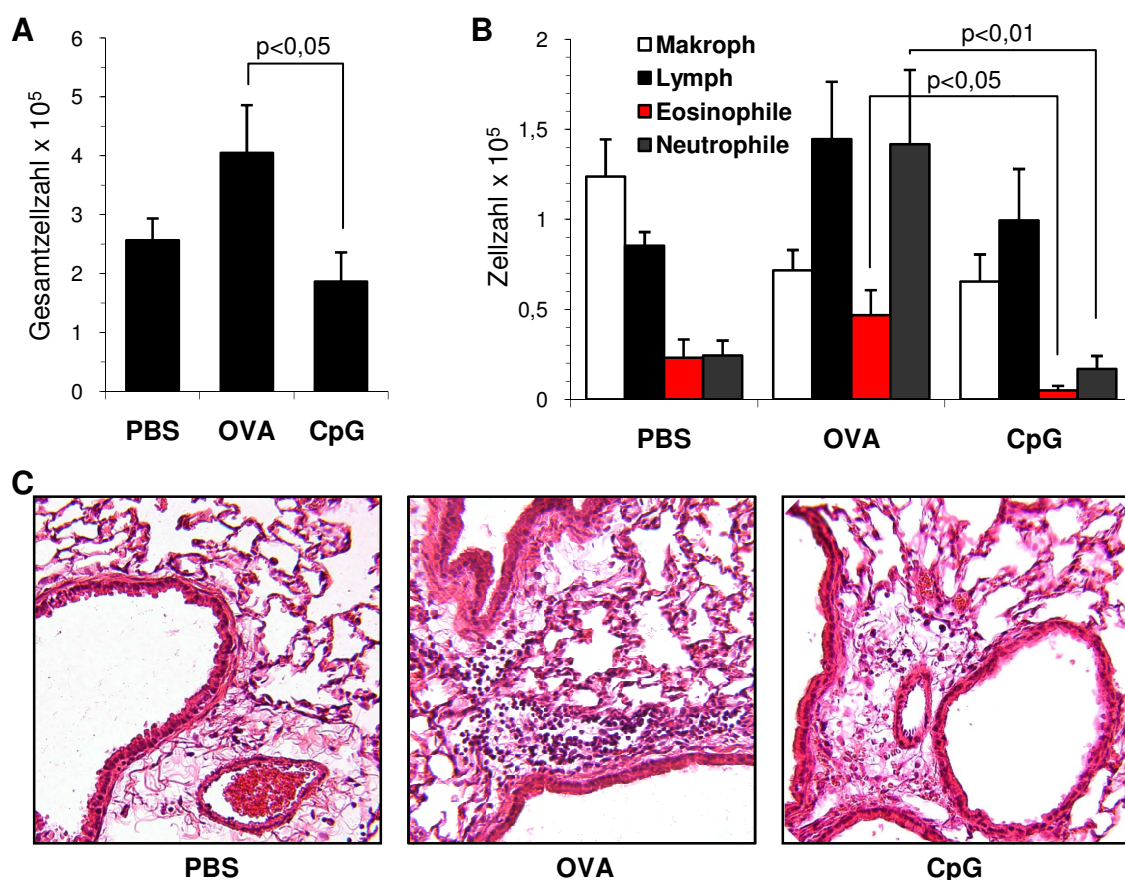


Abb.2.5 CpG inhibiert die allergische Entzündungsreaktion im Th2-Asthmamodell in BALB/c-Mäusen. BALB/c-Mäusen wurden 2×10^6 aus DO11.10 generierte Th2-Zellen i.v. transferiert. Direkt vor dem Transfer wurde den Mäusen der Behandlungsgruppe 20 nmol CpG i.n. appliziert. An den drei darauffolgenden Tagen wurden die Tiere je 20 min inhalativ mit OVA provoziert, die Tiere der negativen Kontrollgruppe inhalierten nur PBS. 24 h nach der dritten Provokation wurden die Tiere getötet. Die Gesamtzellzahlen (A) sowie die Subpopulation (B) in der BAL wurden analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von gepoolten Daten aus zwei Experimenten mit je drei Tieren pro Gruppe. (C) HE-Färbung repräsentativer Gewebsschnitte der Lungen in der Vergrößerung 1:160.

Aufgrund der Zellzahlen aus dem Th2-Asthmamodell in den BALB/c-Mäusen wurden den weniger sensitiven BL6-Mäusen 4 anstatt 2×10^6 Th2-Zellen injiziert und die Allergenprovokationen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. In den BL6-Mäusen der positiven Kontrollgruppe konnte mit $0,5-1 \times 10^5$ Eosinophilen eine bessere Inflammation erzielt werden als in den BALB/c-Mäusen. Die Eosinophilie wurde in den CpG-behandelten Tieren um über 50% reduziert (Abb.2.6B), die Gesamtzellzahl in der BAL um ca. ein Drittel (Abb.2.6A). Auch in den BL6-Mäusen zeigte sich in der Lungenhistologie ein vermehrter Influx von Zellen ins Gewebe der OVA-exponierten Tiere im Vergleich zu den Tieren, die nur PBS inhaliert hatten. Dieser Zellinflux konnte durch die CpG-Behandlung deutlich verringert werden (Abb.2.6C).

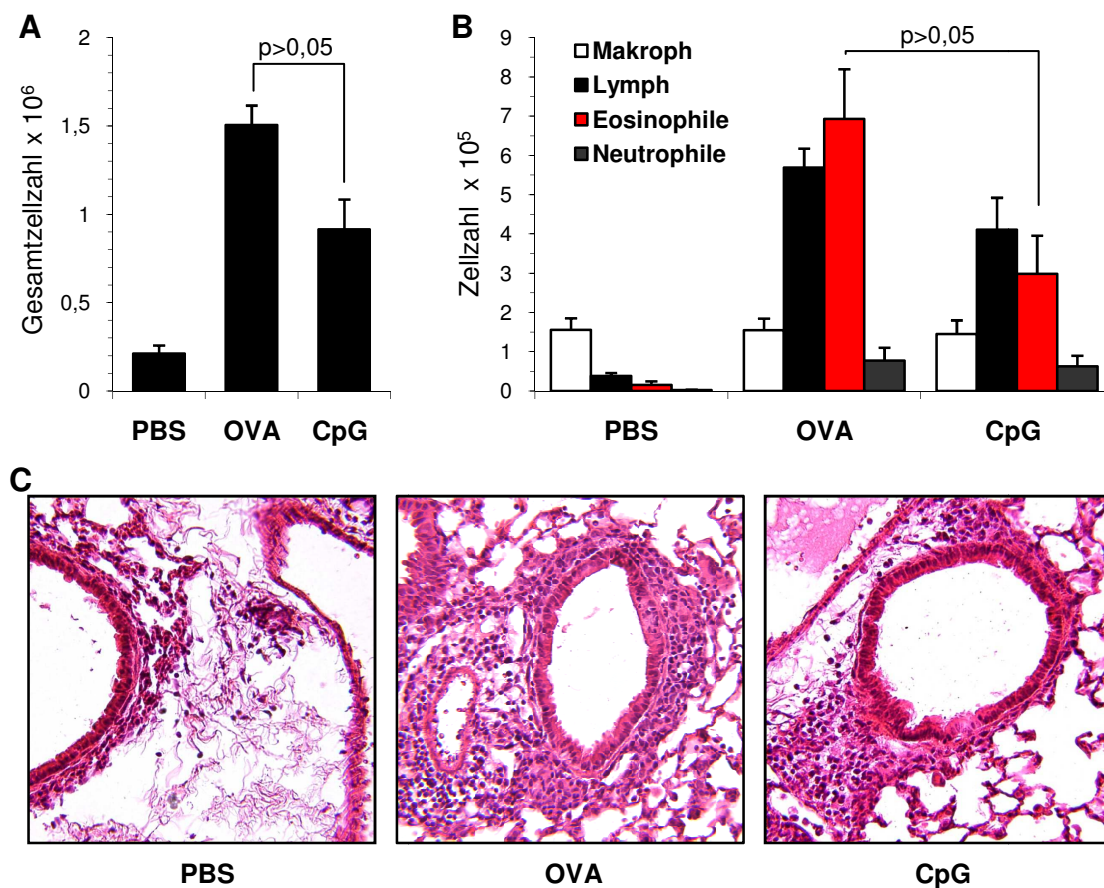


Abb.2.6 CpG inhibiert die allergische Entzündungsreaktion im Th2-Asthmamodell in BL6-Mäusen. BL6-Mäuse wurden 4×10^6 aus OT-II generierte Th2-Zellen i.v. transferiert. Direkt vor dem Transfer wurde den Mäusen der Behandlungsgruppe 20 nmol CpG i.n. appliziert. An den fünf darauffolgenden Tagen wurden die Tiere je 20 min inhalativ mit OVA provoziert, die Tiere der negativen Kontrollgruppe inhalierten nur PBS. 24 h nach der letzten Provokation wurden die Tiere getötet. Die Gesamtzellzahlen (A) sowie die Subpopulation (B) in der BAL wurden analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von gepoolten Daten aus zwei Experimenten mit je drei Tieren pro Gruppe. (C) HE-Färbung repräsentativer Gewebsschnitte der Lungen in der Vergrößerung 1:160.

2.3 Optimierung der Isolierung von dendritischen Zellen

Um den Mechanismus hinter der inhibitorischen Wirkung von CpG bei der Entstehung allergischer Atemwegsentzündungen zu finden, sollte speziell der Effekt von CpG auf die DC untersucht werden. Dazu waren im folgenden direkte Experimente mit den DC aus der Lunge und den mediastinalen LK geplant, für die die Zellen in einer nicht aktivierenden Prozedur und in ausreichenden Mengen isoliert werden sollten. Dafür musste die Präparation der DC zunächst optimiert werden.

2.3.1 DC aus der Lunge

Die Isolierung von DC mittels Dichtegradienten unter Verwendung von Nycodenz und anschließender negativer Depletion mit monoklonalen Antikörpern ist eine in der Literatur gut beschriebene Methode, bei der die DC nicht aktiviert werden [119]. Sie war in unserem Labor zur Präparation von DC aus der Milz bereits fest etabliert. DC sind innerhalb des Organismus von großer Diversität, daher ist für die Gewinnung von DC aus jedem Organ eine andere Dichte des Nycodenz optimal.

Für die Präparation der DC wurde wie bei der Milz verfahren. Die Lungen wurden zerkleinert, verdaut und als Zellsuspension auf den Dichtegradienten gegeben. Die aufgereinigten Zellen wurden dann mit dem für die Milz optimierten Mix monoklonaler Antikörper depletiert. Die Dichte des Nycodenz wurde in verschiedenen Ansätzen von 1,071 bis 1,087 variiert. Nach Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation und der Depletion wurde jeweils die Menge der angereicherten Zellen gezählt und nach der Depletion der Anteil und die Anzahl der DC und Makrophagen durch Antikörperfärbung und Auswertung mit Hilfe der Durchflusszytometrie (*engl.: fluorescence activated cell sorting, FACS*) bestimmt. Die Definition der Zellen erfolgte mit Hilfe der Oberflächenmarker MHC-II und CD11c, wobei DC als CD11c⁺ und MHC-II^{high} und Makrophagen als CD11c⁺ und MHC-II^{low} – Zellen festgelegt wurden (Abb.2.7).

Die Gesamtzellzahl der angereicherten Zellen aus dem Lungengewebe schwankte nach der Dichtegradientenzentrifugation um einen Wert von $2,2 \times 10^6$ mit einem schwachen Maximum bei einer Dichte von 1,075 und nach der Depletion um $0,8 \times 10^6$ ohne dabei ein eindeutiges Optimum zu erreichen (Abb.2.8A). Bei dem bei einer Nycodenzdichte von 1,085 gemessenen vergleichsweise extrem hohen Wert handelte es sich wahrscheinlich um einen durchführungstechnisch bedingten Artefakt, da er nicht in den Kurvenverlauf passte und somit nicht als Optimum gewertet wurde. Der größte prozentuale Anteil an DC in den angereicherten Zellen konnte mit Nycodenz der Dichte 1,073 erzielt werden, die absolute

DC-Zahl erreichte bei einer Dichte von 1,075 ein Maximum (Abb.2.8B). Für die Anwendung dieser Methode zur Isolierung von DC aus der Lunge wurde daher festgelegt, Nycodenz mit der Dichte 1,074 einzusetzen. Das gleiche Ergebnis wie bei den DC wurde auch für die Population der Makrophagen gefunden (Abb.2.8C). Mit der verwendeten Methode zur Anreicherung von DC aus der Lunge wurden somit sowohl DC als auch Makrophagen angereichert.

Um herauszufinden, ob die Makrophagen im Verlauf der Anreicherung der DC eliminiert werden können, waren weitere Optimierungsschritte notwendig. Dazu wurde zunächst die Zunahme der Reinheit der Zellen nach jedem einzelnen Teilschritt der Isolierungsmethode genauer analysiert. Nach dem Verdau, dem Nycodenzgradienten und der Depletion wurden jeweils die Gesamtzahl der Zellen bestimmt sowie die prozentualen Anteile und absoluten Zellzahlen der DC und Makrophagen ermittelt.

Der Anteil der CD11c⁺ Zellen insgesamt wurde mit jedem Anreicherungsschritt erhöht (Abb.2.9B). Das Verhältnis DC zu Makrophagen verschob sich dabei jedoch nicht zugunsten der Population der DC (Abb.2.9C). Mit einer Steigerung des prozentualen Anteils um 5% auf 38% konnten die CD11c⁺ Zellen durch die Depletion nur in geringem Maße weiter angereichert werden (Abb.2.9B). Daraus war zu schließen, dass der auf die Präparation der DC aus der Milz eingestellte Depletionscocktail für die Lunge optimiert werden musste. Die dazu durchgeführten Versuche mit den im Depletionscocktail enthaltenen Antikörpern, antiCD3, antiCD19, antiB220, antiEry und antiGR1, erzielten jedoch kein zufriedenstellendes Ergebnis. Zusätzlich blieb das Problem der alveolären Makrophagen, die sich nicht durch Depletion aus der Zellsuspension entfernen ließen.

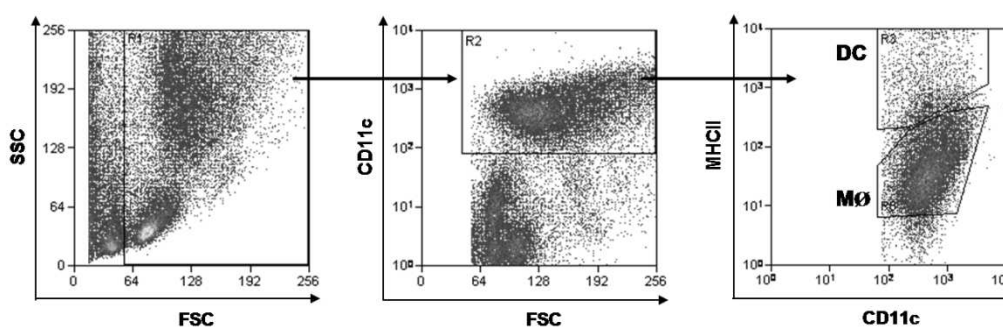


Abb.2.7 Definition von DC und Makrophagen in der Lunge. Die Lungen von BL6-Mäusen wurden zerkleinert, mit Collagenase und DNase verdaut, und die Zellsuspension dann über einen Nycodenz-Dichtegradienten und anschließende Depletion mit einem Antikörpermix (antiCD3, antiCD19, antiB220, antiGR1 und antiEry) angereichert. Die Zellen wurden 30 min mit CD11c-FITC und MHC-II-PE Antikörpern gefärbt und dann mit Hilfe einer FACS-Analyse ausgewertet. DC wurden als CD11c⁺ und MHC-II^{high} und Makrophagen als CD11c⁺ und MHC-II^{low} festgelegt.

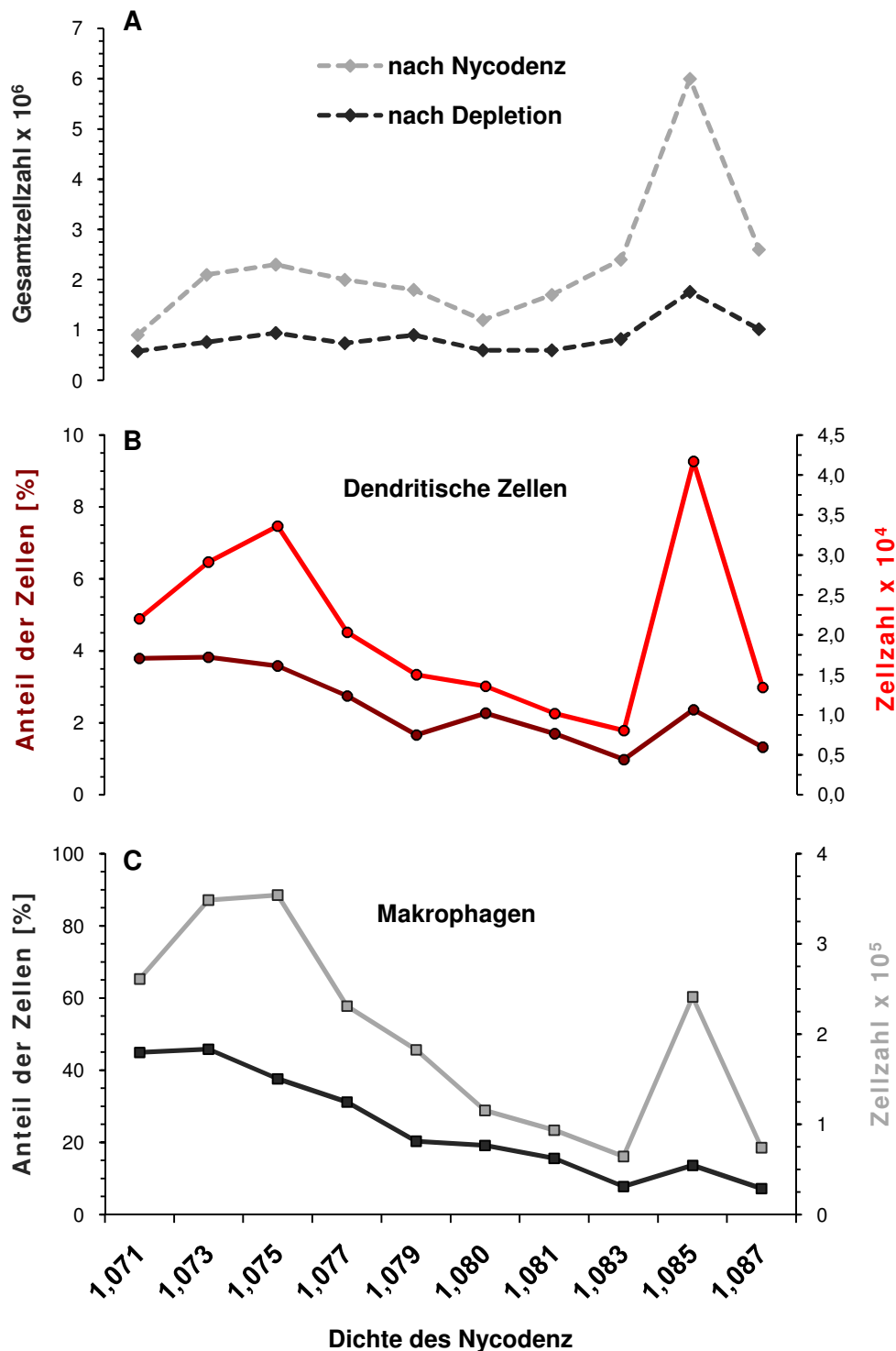


Abb.2.8 Optimierung der Nycodenzdichte für die Anreicherung von Lungen-DC. Die Lungen von 12 BL6-Mäusen wurden zerkleinert, mit Collagenase und DNase verdaut, und die Zellsuspension zur Dichtegradientenzentrifugation auf Nycodenzlösungen steigender Dichte verteilt. Anschließend erfolgte die Depletion mit einem Antikörpermix (antiCD3, antiCD19, antiB220, antiGR1 und antiEry). Die Zellen wurden jeweils nach der Dichtegradientenzentrifugation und dem Depletionsschritt gezählt (A). Die prozentualen Anteile der CD11c⁺ und MHC-II^{high} DC (B) und CD11c⁺ und MHC-II^{low} Makrophagen (C) wurden nach der Depletion mittels FACS-Analyse bestimmt und die absoluten Zellzahlen über die Gesamtzellzahl berechnet.

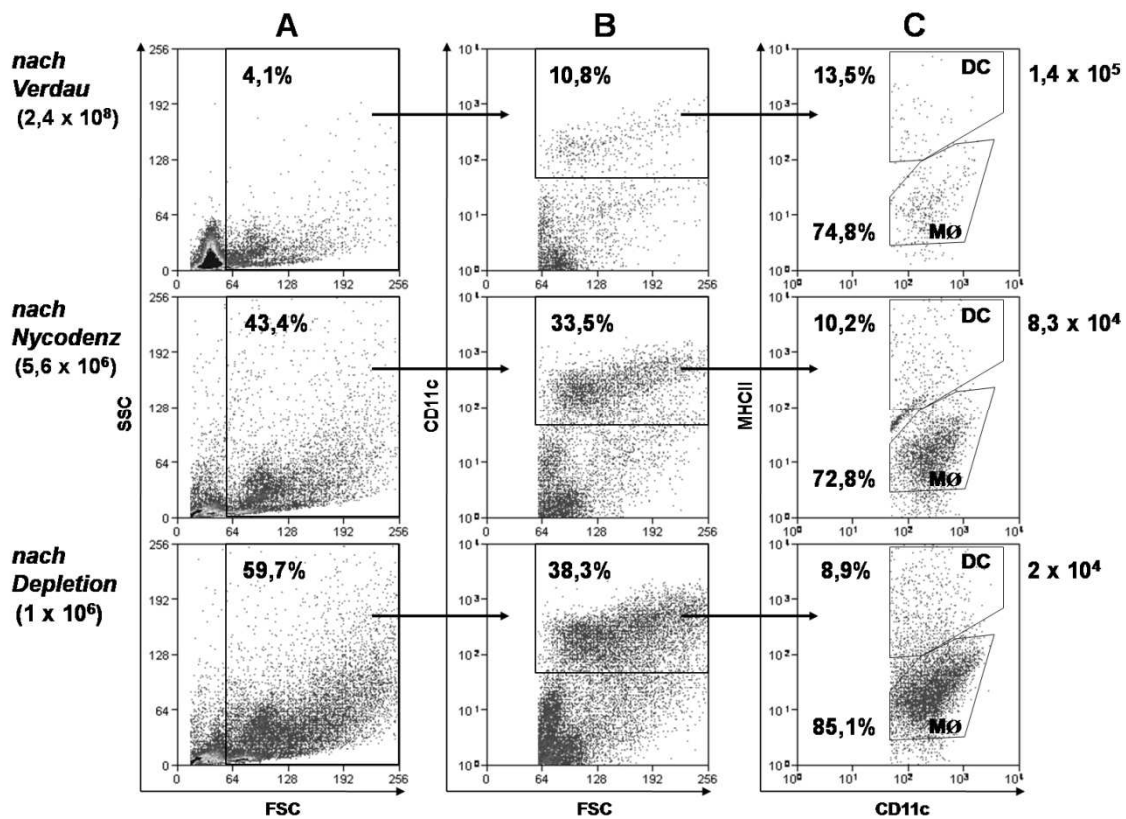


Abb.2.9 Resultate der Anreicherungsschritte bei der Isolierung von DC aus der Lunge. Die Lungen von zwei BL6-Mäusen wurden zerkleinert, mit Collagenase und DNase verdaut, und die Zellsuspension über einen Nycodenzgradienten der Dichte 1,074 und anschließende Depletion mit einem Antikörpermix (antiCD3, antiCD19, antiB220, antiGR1 und antiEry) angereichert. Die aufgereinigten Zellen wurden mit CD11c-FITC und MHC-II-PE gefärbt und mittels FACS-Analyse ausgewertet. Die Zellzahlen rechts im Bild repräsentieren die errechneten Absolutwerte der DC.

Der geringe Aufreinigungseffekt durch die Depletion wog außerdem nicht den hohen Zellverlust an DC von 75% auf. Deshalb wurde beschlossen, die Methode zur Isolierung von DC aus der Lunge ohne den Depletionsschritt durchzuführen. Um trotzdem aufgereinigte DC aus der Lunge gewinnen zu können, wurde entschieden, die aus der Lunge isolierten Zellen nach der Dichtegradientenzentrifugation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu färben und der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung zuzuführen. Dabei sollte der Anreicherungsschritt des Nycodenzgradienten beibehalten werden, da mit ihm ein großer Teil der Erythrozyten und des Zelldebris, wie in Abb.2.9A zu erkennen ist, abgetrennt wurde. Dadurch verkürzt sich die Zeitdauer der Zellsortierung und die Vitalität der DC wird weniger eingeschränkt.

In den vorhergehenden Versuchen waren die pulmonalen DC als CD11c⁺MHC-II^{high} definiert gewesen (siehe Abb.2.7). Durch die vorgelagerte Eingrenzung von vorrangig CD11c^{high}

Zellen bei der Analyse wurden die DC wahrscheinlich nicht vollständig erfasst, da die Population der DC teilweise bis in den CD11c-intermediären Bereich hineinreicht. Daher wurde eine Änderung in der Festlegung der Gates, die in Anlehnung an die Beschreibung von Lungenzellen in der Literatur erfolgte [123], vorgenommen. Hierbei wurde von allen Zellen, die im Größengate lagen, die Expression von CD11c und MHC-II betrachtet. Die Population der DC stellte sich als $CD11c^{\text{intermediate-high}} MHC-II^{\text{high}}$ dar (Abb.2.10).

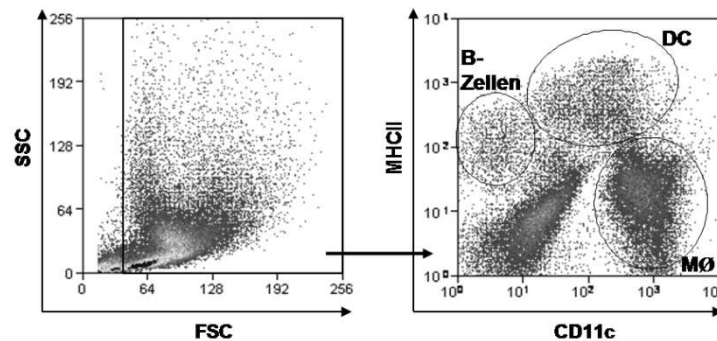


Abb.2.10 Definition der Zellpopulationen in der Lunge. Lungengewebe von BL6-Mäusen wurde zerkleinert, mit Collagenase und DNase verdaut und über einen Nycodenzgradienten aufgereinigt. Die danach CD11c-FITC und MHC-II-PE gefärbten Zellen wurden mittels FACS-Analyse bestimmt.

Unter den optimierten Bedingungen sollten nun die DC aus den Lungen von unbehandelten und CpG-behandelten Mäusen isoliert werden. Dazu wurden BL6-Mäusen 24 h nach der intranasalen Applikation von CpG die Lungen entnommen und mit denen von wt-Tieren verglichen. Von den aus dem Lungengewebe angereicherten Zellen wurde der prozentuale Anteil der DC-Population per FACS-Analyse, wie in Abb.2.10 beschrieben, bestimmt. Aus diesen Werten und der Gesamtzellzahl der angereicherten Zellen wurde die Anzahl der DC errechnet. Bereits in den ersten Experimenten zeigte sich, dass aus den Lungen CpG-behandelter Tiere gegenüber unbehandelten Tieren eine erhöhte Anzahl DC gewonnen wurde. So konnten für alle Folgeexperimente, in denen DC untersucht werden sollten, bereits weniger Tiere für die Behandlungsgruppe eingeplant werden.

Um eine statistisch fundierte Aussage über die DC-Zahlen machen zu können, wurden die Daten aus allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente, bei denen CpG am Vortag appliziert und die DC am folgenden Tag isolierte wurden, zusammengefasst. Die absolute Zahl der DC in der Lunge verdoppelte sich durch die CpG-Behandlung, obwohl der prozentuale Anteil der DC signifikant um durchschnittlich 20% erniedrigt war (Abb.2.11).

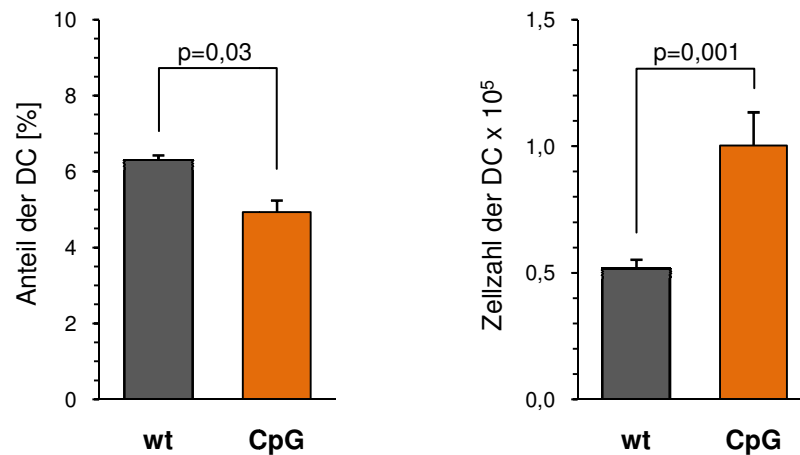


Abb.2.11 CpG-Behandlung führt zur Zunahme der DC in der Lunge. BL6-Mäuse wurden einen Tag vor Entnahme der Lungen mit 20 nmol CpG behandelt (CpG) oder unbehandelt gelassen (wt). Die aus den Lungen isolierten Zellen wurden nach der Aufreinigung über einen Nycodenzgradienten gezählt und der Anteil der DC mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die gezeigten Daten sind pro Maus berechnet und repräsentieren Mittelwerte und SEM aus 14 Experimenten mit 2-4 Tieren pro Gruppe.

Um die DC aus den CpG-behandelten und unbehandelten Tieren zur Durchführung von *in vitro* Versuchen möglichst rein zur Verfügung zu haben, wurden die DC aus den über den Nycodenzgradienten aufgereinigten Lungenzellen mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung angereichert.

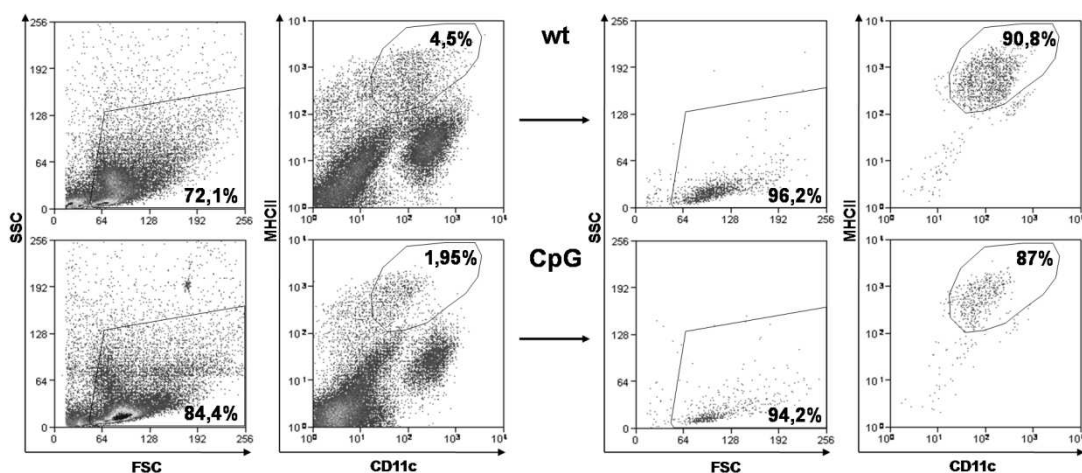


Abb.2.12 Anreicherung von DC aus der Lunge durch Zellsortierung. BL6-Mäuse wurden einen Tag vor Entnahme der Lungen mit 20 nmol CpG behandelt (CpG) oder unbehandelt gelassen (wt). Nach der Aufreinigung der aus den Lungen isolierten Zellen über einen Nycodenzgradienten wurden die DC mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung angereichert. Links im Bild sind die Lungenzellen vor der Sortierung und auf der rechten Seite die reinen DC zu sehen. Ein für 10 Experimente stehendes repräsentatives Beispiel ist dargestellt.

Mit der in Abb.2.10 beschriebenen Strategie der Gatesetzung sollte bei der Zellsortierung eine maximale Ausbeute an DC erzielt werden. Die DC lagen nach der Zellsortierung in einer Reinheit von über 85% vor (Abb.2.12).

Abschließend sollte noch die Problematik der Autofluoreszenz von Zellen aus der Lunge genauer betrachtet werden. Wie in der Literatur beschrieben [114] werden die CD11c⁺ Zellen in stark und schwach autofluoreszierende Zellen unterteilt, wobei die starke Autofluoreszenz den alveolären Makrophagen zugeschrieben wird. Aus den Lungen von am Vortag mit CpG-behandelten und nicht behandelten BL6-Mäusen isolierte Zellen wurden mit Fluorochrom konjugierten Antikörpern gegen CD11c und MHC-II markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

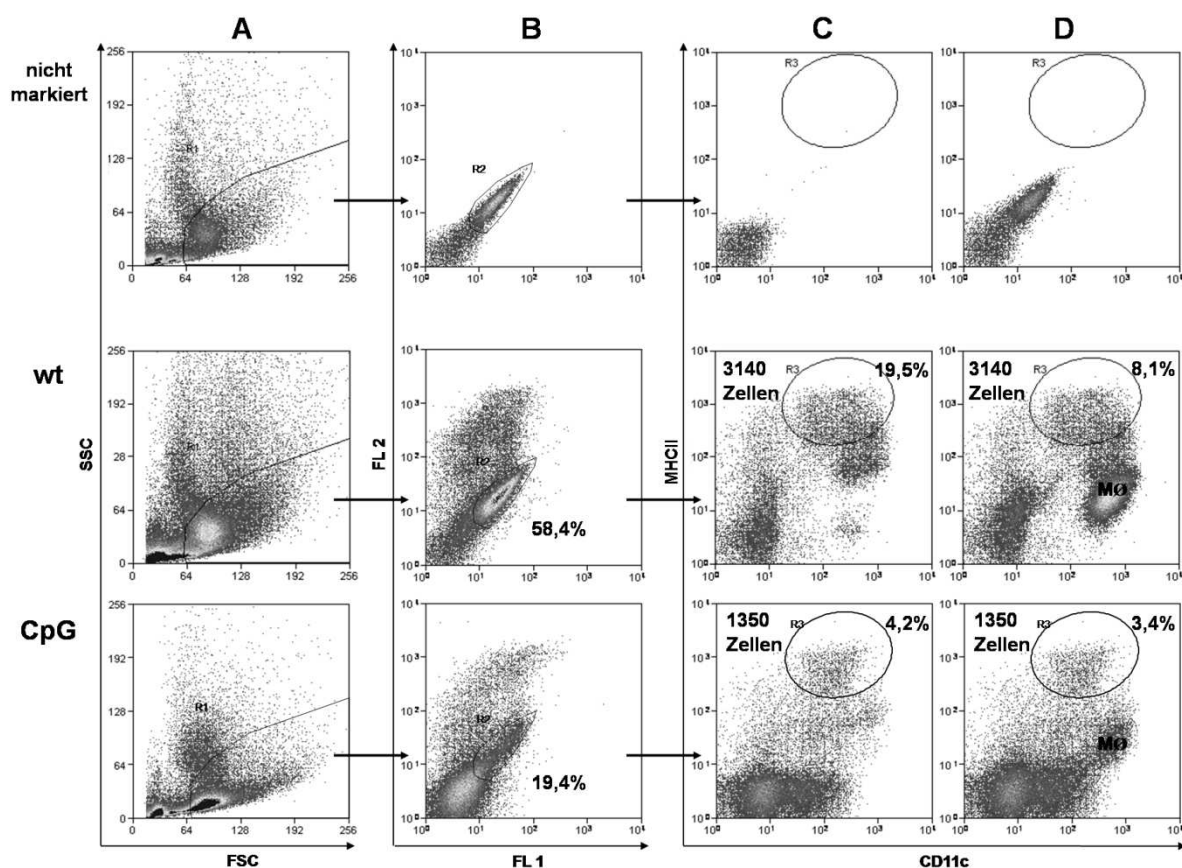


Abb.2.13 Untersuchungen zur Autofluoreszenz von aus der Lunge isolierten Zellen. BL6-Mäuse wurden einen Tag vor Entnahme der Lungen mit 20 nmol CpG behandelt (CpG) oder unbehandelt gelassen (wt). Nach Aufreinigung der aus den Lungen isolierten Zellen über einen Nycodenzgradienten wurden die Zellen mit CD11c-APC und MHC-II-PE markiert und mittels FACS analysiert. Dazu wurden sowohl von der wt- als auch CpG-Probe 40.000 Zellen in das Größengate geladen (A, mittleres und unteres Bild). In der obersten Reihe sind nicht markierte Zellen von wt-Tieren dargestellt. Das Gate der autofluoreszierenden Zellen (B) wurde in den CD11c/ MHC-II-Dot-Plots entweder ausgeschlossen (C) oder mit einbezogen (D).

Zur besseren Vergleichbarkeit der beiden Proben, wt und CpG, wurden die gleichen Zellzahlen in das Größengate geladen (Abb.2.13A). Zuerst wurde in einer Dot-Plot mit den gegenübergestellten leeren Kanälen FL1 und FL2 das Gate um die autofluoreszierenden Zellen festgelegt (Abb.2.13B, oben). In der darauffolgenden Darstellung der Parameter MHC-II gegen CD11c wurden die autofluoreszierenden Zellen entweder ausgeschlossen (Abb.2.13C) oder mit in die Auswertung einbezogen (Abb.2.13D). Sowohl die Analyse der Zellen aus wt-Mäusen als auch aus CpG-behandelten Mäusen führte zu dem Ergebnis, dass der prozentuale Anteil der DC durch die Ausgrenzung der autofluoreszierenden Zellen erhöht werden konnte. Das resultierte jedoch nicht darin, dass quantitativ mehr DC erfasst wurden. Der Ausschluss der autofluoreszierenden Zellen hatte vorrangig Einfluss auf die Population der Makrophagen. In Bezug auf die Anreicherung von DC aus der Lunge konnte damit festgestellt werden, dass die in Abb.2.12 gezeigte einfache Gatesetzung ausreichend ist, da die Problematik der autofluoreszenten Makrophagen durch die Zellsortierung umgangen wird.

2.3.2 DC aus den mediastinalen Lymphknoten

Die Aufreinigung von DC über einen Dichtegradienten ist nur sinnvoll, wenn ausreichend Material des zu analysierenden Gewebes zur Verfügung steht. Bei den mediastinalen LK handelt es sich um sehr kleine Organe, deshalb wurde die Anwendung des Nycodenzgradienten nicht in Betracht gezogen. Da die LK ebenso wie die Milz ein sekundäres lymphatisches Organ sind und aus ähnlichen T-Zellen und B-Zellen enthaltenden Arealen aufgebaut sind, wurden Versuche unternommen, die DC mit Hilfe des für die Milz optimierten Antikörpermixes durch Depletion anzureichern. Wegen des fehlenden Zwischenschritts der Dichtegradientenzentrifugation war die zu depletierende Zahl an T- und B-Zellen wesentlich größer als bei der Aufreinigung der DC aus der Milz. Daher wurde der Depletionscocktail an die veränderten Bedingungen adaptiert, indem die Konzentrationen der Antikörper antiCD3, antiCD19 und antiB220 erhöht wurden.

Die DC wurden sowohl aus wt-Tieren als auch aus CpG-behandelten BL6-Mäusen angereichert. Den Tieren wurden einen Tag nach CpG-Applikation die mediastinalen LK sowie zum Vergleich die inguinalen LK entnommen und vor der Depletion mit Collagenase und DNase verdaut. Nach der Depletion wurden die angereicherten Zellen gezählt, mit Fluorochrom konjugiertem CD11c als Marker für DC angefärbt und mittels FACS-Analyse ausgewertet. Aus den Zellsuspensionen aller LK konnten die DC bis zu maximal 10% angereichert werden (Abb.2.14B, links). Auffallend dabei war, dass speziell die Reinheit von DC aus den mediastinalen LK von unbehandelten Mäusen nicht über 5% gesteigert werden

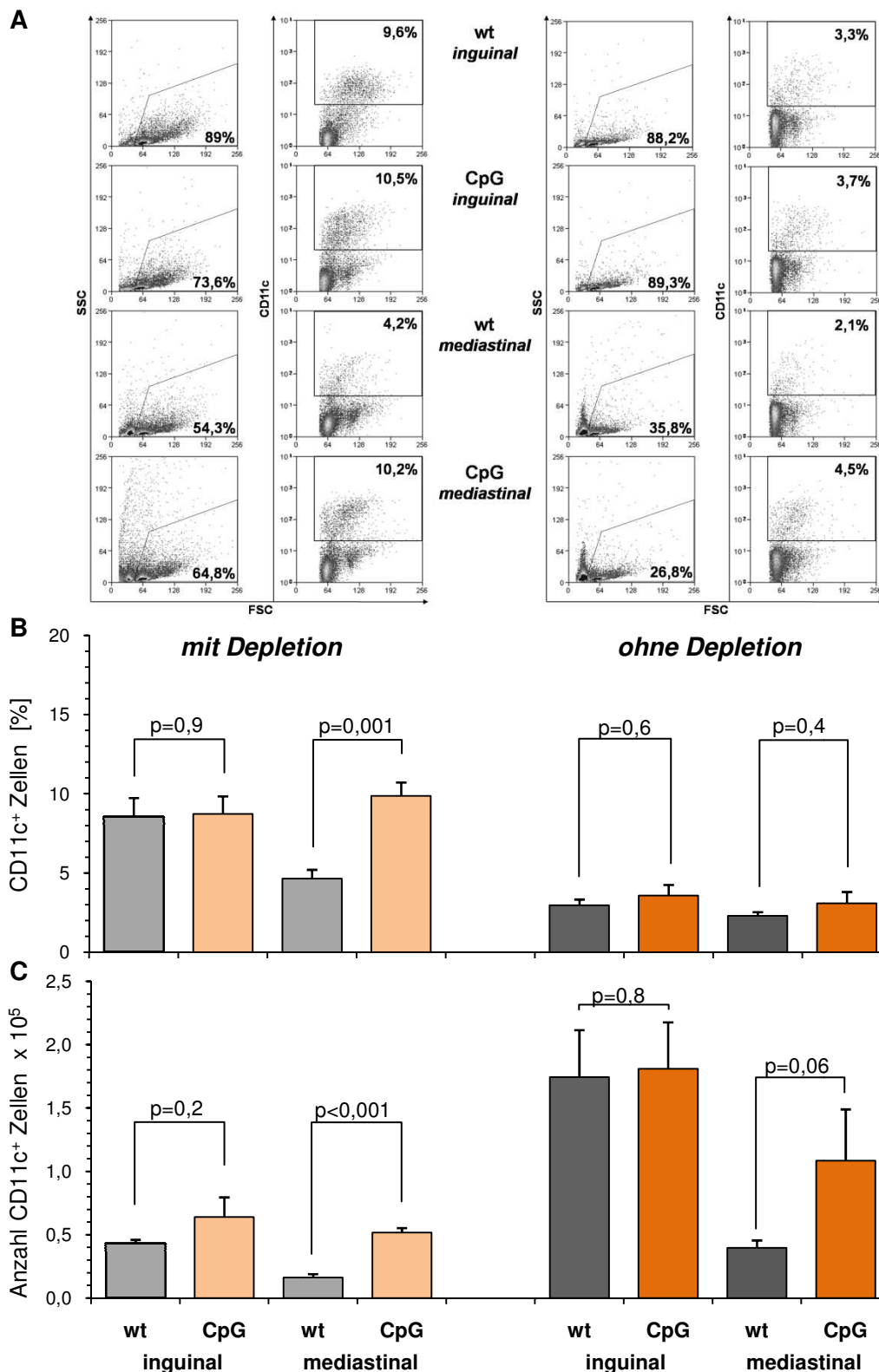


Abb.2.14 Anreicherung von DC aus LK. Die mediastinalen und inguinalen LK von nicht behandelten (wt) oder am Vortag CpG-behandelten BL6 (CpG) wurden mit Collagenase und DNase verdaut und mit einem Antikörpercocktail aus antiCD3, antiCD19, antiB220, antiGR1 und antiEry depletiert. Die resultierenden Zellsuspensionen wurden nach CD11c-FITC-Färbung und FACS-Analyse mit nicht depletierten LK-Suspensionen verglichen. Im Bild sind repräsentative Beispiele der Auswertung der FACS-Daten (A), die prozentualen Anteile (B) und die absoluten Zellzahlen (C) der DC gezeigt. Alle Daten in B und C sind Mittelwerte und SEM aus fünf Experimenten mit 2-4 Tieren pro Gruppe.

konnte. In Bezug auf die absoluten DC-Zahlen wurde aus den mediastinalen LK von CpG-behandelten Tieren die dreifache Anzahl DC im Vergleich zu wt-Tieren isoliert (Abb.2.14C, links). Daraus war zu folgern, dass nach intranasaler CpG-Behandlung die Anzahl der DC in den mediastinalen LK signifikant ansteigt.

Das unbefriedigende Anreicherungsergebnis von maximal 10% DC in den aufgereinigten Zellsuspensionen der verdauten LK führte zu dem Schluss, dass die Depletion der großen Anzahl T- und B-Zellen ohne den vorgelagerten Nycodenzgradienten nicht bewältigt werden konnte. Um reine DC-Populationen für *in vitro* Experimente zu erhalten, musste auch hier die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung angewendet werden. Dabei stellte sich die Frage, ob der Depletionsschritt dann noch notwendig war oder die Zellsuspensionen der LK gleich im Anschluss an den Verdau sortiert werden sollten. Hierzu wurden die Daten aus den Depletionsversuchen mit Daten aus Experimenten verglichen, in denen die Zellsuspensionen nur durch Verdau der LK hergestellt worden waren. Ohne Depletion war der prozentuale Anteil der DC um fast zwei Drittel geringer als mit Depletion (Abb.2.14B), wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen Zellsuspensionen aus den mediastinalen LK von wt- und CpG-behandelten Mäusen zeigte. Die absolute Anzahl DC war in nicht depletierten LK-Suspensionen mindestens doppelt so hoch wie in depletierten (Abb.2.14C). Dabei waren in den mediastinalen LK generell weniger DC vorhanden als in inguinalen LK. In den mediastinalen LK von CpG-behandelten Mäusen lag die DC-Zahl um mehr das Doppelte über der Anzahl DC aus mediastinalen LK von wt-Tieren, obwohl der Unterschied durch die große Varianz der Daten nicht signifikant war. Letztendlich wurde der Depletionsschritt zugunsten einer größeren Ausbeute an DC bei der Zellsortierung nicht weiter durchgeführt, da er nur unnötige Zellverluste bedingte.

Die DC aus den mediastinalen LK, die durch Verdau der LK und Sortierung der Zellsuspensionen isoliert worden waren, wurden in Proliferationsassays zur Stimulation von T-Zellen eingesetzt. Die Proliferation der T-Zellen entsprach in einigen Experimenten nicht den Erwartungen. Dafür wurde als eine mögliche Ursache auch die Aufreinigung der DC aus den LK in Erwägung gezogen. Deshalb wurden die LK nicht mehr verdaut, sondern durch leichtes Zerreißen und Schwenken dissoziiert. Durch die kurzzeitige Dissoziation sollten die DC auf schonendere Weise präpariert und damit ihre Vitalität besser erhalten werden. Um zu zeigen, dass auch ohne Verdau die gleiche Menge DC aus den LK gewonnen werden kann, wurden die Daten aus Experimenten, in denen die LK dissoziiert wurden, retrospektiv mit den Daten von DC-Präparationen, in denen die LK verdaut wurden, verglichen. Betreffs der Anzahl isolierter DC wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Präparationsmethoden festgestellt (Abb.2.15). Außerdem wurde mit den DC-Daten aus den Dissoziationsversuchen bestätigt, dass die DC in den mediastinalen LK nach CpG-

Behandlung deutlich zunehmen. Sowohl die Verdopplung des prozentualen Anteils der DC (A) als auch die Steigerung der absoluten DC-Zahl auf das Dreifache (B) waren hier stark signifikant.

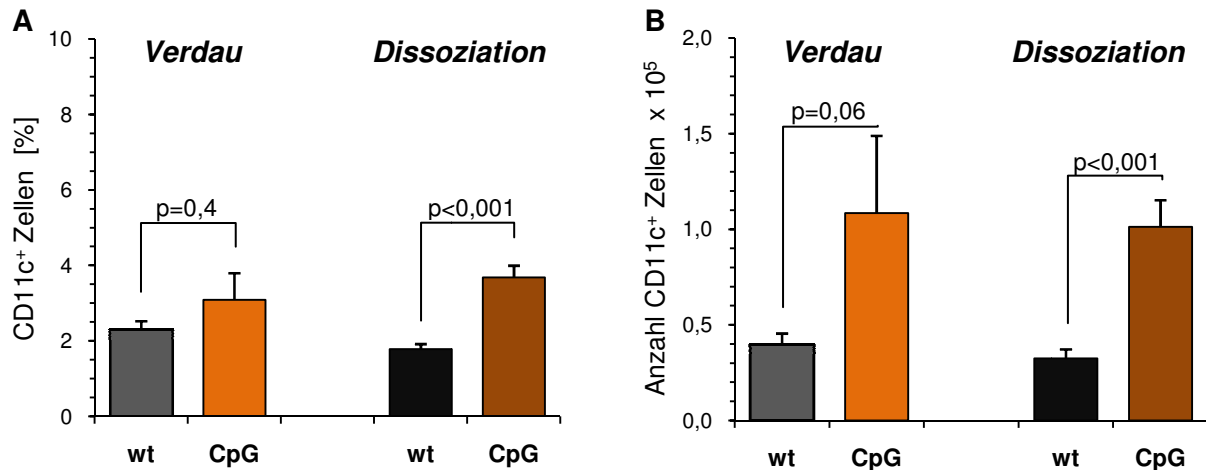


Abb.2.15 Vergleich von Präparationsmethoden bei der Isolierung von DC aus mediastinalen LK. Die mediastinalen LK von nicht behandelten (wt) oder am Vortag CpG-behandelten BL6-Mäusen (CpG) wurden entweder mit Collagenase und DNase verdaut oder mechanisch dissoziiert. Danach wurden die Zellen CD11c-FITC gefärbt und mittels FACS analysiert. Alle Daten sind Mittelwerte und SEM aus fünf (Verdau) bzw. neun (Dissoziation) Experimenten mit 2-4 Tieren pro Gruppe. Dabei handelt es sich bei den Werten für den Verdau um die gleichen Daten wie in Abb.2.14.

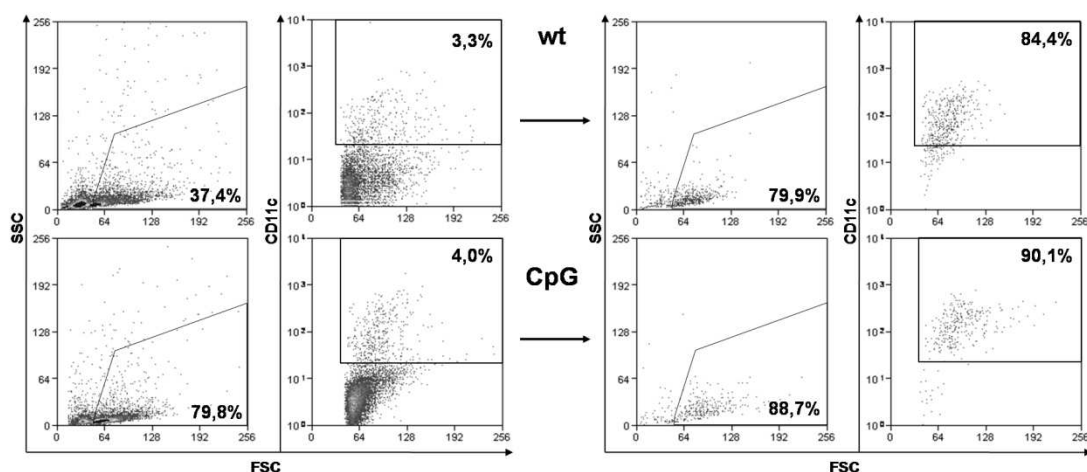


Abb.2.16 Anreicherung von DC aus den mediastinalen LK durch Zellsortierung. BL6-Mäuse wurden einen Tag vor Entnahme der mediastinalen LK mit 20 nmol CpG behandelt oder unbehandelt gelassen (wt). Die DC wurden nach mechanischer Dissoziation der LK mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung aus den CD11c-FITC gefärbten Zellsuspensionen angereichert. Links im Bild sind die Zellsuspensionen vor der Sortierung und auf der rechten Seite die reinen DC zu sehen. Ein für fünf Experimente stehendes repräsentatives Beispiel ist dargestellt.

Die DC aus den mediastinalen LK waren, ebenso wie die Lungen-DC, für *in vitro* Experimente vorgesehen, in denen die DC möglichst rein benötigt wurden. Nach Auswertung der vorherigen Versuche wurde letztendlich die Dissoziation der LK mit anschließender Zellsortierung der Zellsuspensionen als Methode zur Gewinnung der DC ausgewählt. Durch die Zellsortierung wurden die DC zu mehr als 80% angereichert (Abb.2.16).

2.4 Untersuchung des Effekts von CpG auf die pulmonalen DC

Die Ursachen hinter der inhibitorischen Wirkung von CpG-ODN bei der Entstehung allergischer Atemwegsentzündungen sind nur unzureichend aufgeklärt. Die bisher gezeigten Mechanismen beschreiben die Verhinderung der allergischen Entzündungsreaktion über die Inhibition der IgE abhängigen Ausschüttung von Th2-Cytokinen und der Aktivierung der Allergen spezifischen Th2-Zellen sowie der Suppression der T-Zellen durchIDO [35,39].

Ein weiterer Mechanismus könnte in dem Einfluss von CpG-ODN auf die Antigenpräsentation der pulmonalen DC liegen. So ist bekannt, dass CpG durch Aktivierung der DC die Antigenpräsentation nachfolgender Antigenen verhindert [128,132]. Um Beweise für diese Hypothese zu finden, sollten durch die direkte Untersuchung des Effekts von CpG auf die DC in der Lunge und den mediastinalen LK weiterführende Erkenntnisse zur Unterlegung dieser Hypothese eruiert werden.

2.4.1 Maturierung pulmonaler DC durch CpG

Zunächst musste untersucht werden, ob die DC in der Lunge und den mediastinalen LK durch die Gabe von CpG aktiviert werden. Dazu wurde BL6-Mäusen CpG intranasal appliziert und 24 h später die DC aus den Lungen, den mediastinalen LK und zum Vergleich den inguinalen LK analysiert. Die DC der CpG-behandelten Mäuse wurden sowohl mit denen von unbehandelten Tieren als auch denen von intranasal mit MALP-2 behandelten Tieren verglichen.

Die MHC-Klasse-II-Moleküle sowie die Aktivierungsmarker CD80 und CD86 waren auf den DC aus den Lungen und den mediastinalen LK der CpG-behandelten BL6 stärker exprimiert als auf den DC aus unbehandelten Tieren, was sich in einer höheren durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (*engl.: mean fluorescence intensity, MFI*) bei der FACS-Analyse widerspiegelte (Abb.2.17). Die Hochregulation von MHC-II, CD80 und CD86 wurde durch die CpG-Behandlung in ähnlichem Maße erreicht wie durch die Behandlung mit dem TLR2/6-Liganden MALP-2. Für die DC aus den inguinalen LK konnte keine höhere Expression der

untersuchten Moleküle in CpG oder MALP-2 behandelten Tieren festgestellt werden. Daraus war zu schließen, dass die Maturierung der DC durch die intranasale CpG- bzw. MALP2-Gabe spezifisch für die pulmonalen DC war.

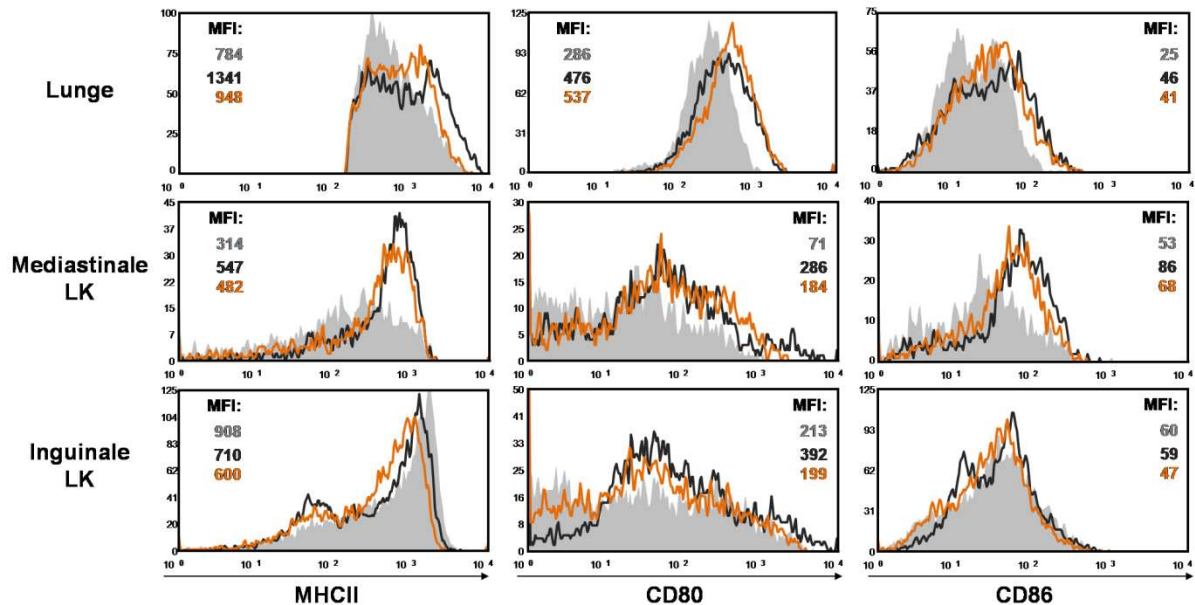


Abb.2.17 Maturierung pulmonaler DC durch CpG und MALP-2. BL6-Mäuse wurden einen Tag vor der Entnahme der Lunge, der mediastinalen und inguinalen LK intranasal mit 20nmol CpG (orange) oder 1 µg MALP-2 (dunkelgrau) behandelt oder unbehandelt gelassen (hellgrau). Die Zellen aus der Lunge wurden nach dem Nycodenzgradienten mit Fluorochrom konjugierten CD11c- und MHC-II-Antikörpern sowie Antikörpern gegen die dargestellten Marker gefärbt und mittels FACS-Analyse ausgewertet. Die in den entsprechenden Histogrammen dargestellten Daten beziehen sich auf die Population der CD11⁺ MHC-II⁺ Zellen (obere Reihe). Die Histogramme der analysierten LK-Zellsuspensionen repräsentieren die CD11c⁺Zellen (mittlere und untere Reihe). Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 4 Experimente.

2.4.2 *In vivo* – Antigenpräsentation nach CpG-Applikation

Nach dem gezeigt wurde, dass die DC in der Lunge und den mediastinalen LK einen Tag nach der intranasalen Applikation von CpG aktiviert sind, sollte die Antigenpräsentation der pulmonalen DC von nachfolgend verabreichten Antigenen genauer untersucht werden. Dazu wurden CpG-behandelte oder nicht behandelte BL6-Mäuse 24 h nach der Applikation inhalativ mit dem Antigen OVA provoziert. Gleichzeitig wurden den Tieren naive CFSE-markierte OVA-spezifische T-Zellen intravenös transferiert. Drei Tage nach der Antigenprovokation wurden die transferierten T-Zellen aus den mediastinalen LK und zum

Vergleich aus den inguinalen LK wiedergewonnen und auf ihr Proliferationsverhalten untersucht. Im Falle der Antigenaufnahme durch die DC in der Lunge und anschließender Antigenpräsentation in den mediastinalen LK sollten die transferierten T-Zellen stimuliert und zur Proliferation angeregt worden sein. Die Anzahl der proliferierten T-Zellen ließ indirekt auf das Maß der Antigenpräsentation der DC schließen. Die OVA-Präsentation der DC wurde sowohl auf Klasse-II-Ebene mit OT-II als auch auf Klasse-I-Ebene mit OT-I untersucht.

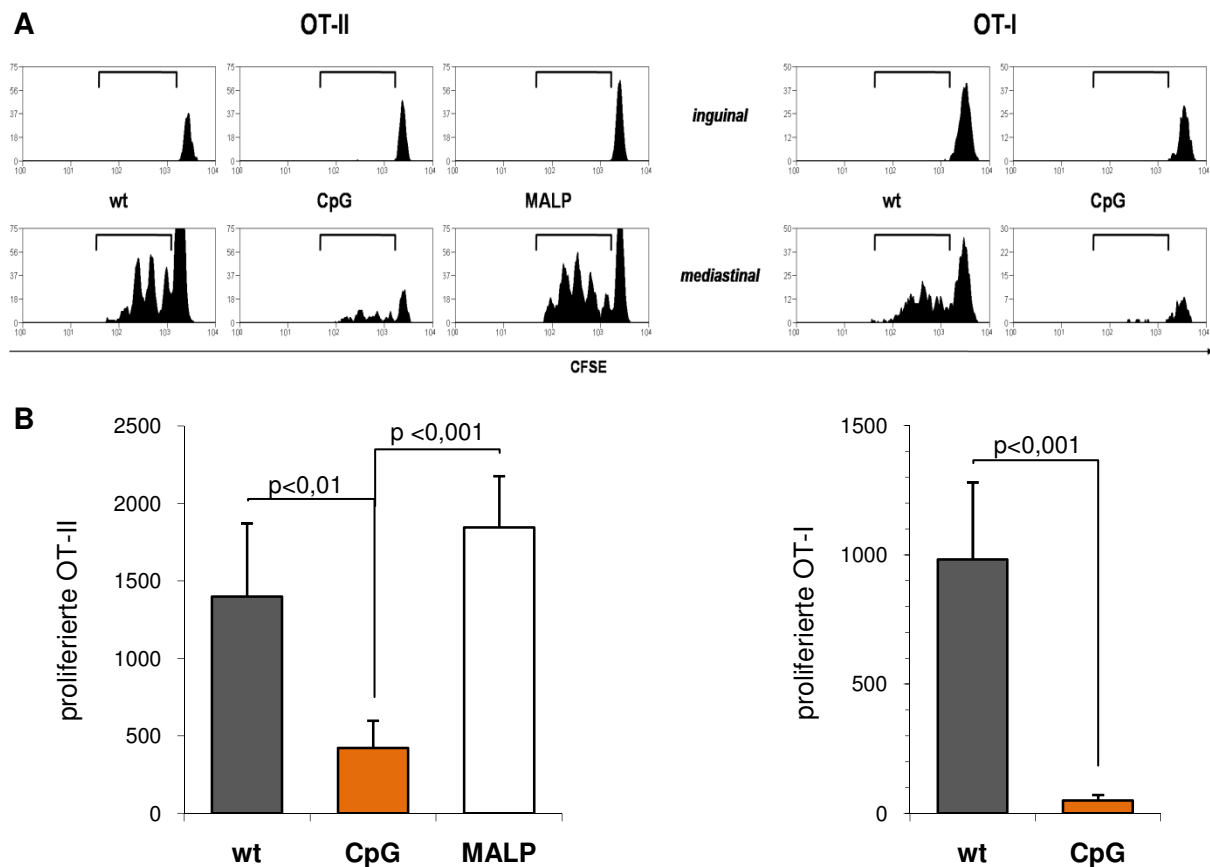


Abb.2.18 Reduktion der Proliferation von adoptiv transferierten OVA-spezifischen T-Zellen nach CpG-Behandlung. BL6-Mäuse wurden intranasal mit 20 nmol CpG, 1 µg MALP-2 oder gar nicht (wt) behandelt. 24 h und 48 h später wurden die Tiere 20 min inhalativ 1% OVA in PBS exponiert. Eine Stunde vor der ersten Exposition wurden den Tieren $2-3 \times 10^6$ CFSE-gelabelte OT-II bzw. OT-I i.v. transferiert. 60 h nach der ersten Antigenprovokation wurden die mediastinalen und inguinalen LK der Mäuse analysiert. A) Mittels FACS-Analyse erstellte repräsentative Bilder der Proliferation der T-Zellen. Jeder Peak unter den Anzeigebalken repräsentiert eine Generation proliferierter Zellen, in denen die Fluoreszenz des CFSE halbiert wurde. B) Quantitative Darstellung der proliferierten T-Zellen aus den mediastinalen LK. Die Graphen zeigen die Mittelwerte der gepoolten Ergebnisse von vier (OT-II) bzw. zwei (OT-I) Experimenten mit drei Tieren pro Gruppe.

Wie erwartet proliferierten die OT-II- und OT-I-Zellen in den mediastinalen LK von unbehandelten Tieren, in den inguinalen LK konnten keine proliferierten T-Zellen wiedergefunden werden. Damit wurde demonstriert, dass das intranasal applizierte OVA spezifisch von den DC aus der Lunge in den dieses Organ drainierenden LK präsentiert wurde. In Abb.2.18 sind repräsentative Bilder für die Proliferation der OT-II und OT-I in den mediastinalen und inguinalen LK zu sehen, die proliferierten T-Zellen aus den mediastinalen LK wurden quantitativ in Grafiken dargestellt. In CpG-behandelten Tieren war die Proliferation beider OVA-spezifischer T-Zellen, OT-II und OT-I, in den mediastinalen LK deutlich verringert. Die Proliferation von OT-II wurde auch in MALP-2 behandelten Mäusen untersucht. In diesen Tieren proliferierte sogar eine größere Anzahl OT-II als in den unbehandelten Mäusen. Die Gabe von MALP-2 hatte somit auf Klasse-II-Ebene keinen reduzierenden Effekt auf die Präsentation des nachfolgend verabreichten OVA, während die Klasse-II-Präsentation als auch die Klasse-I-Präsentation des Antigens nach der Applikation von CpG signifikant inhibiert waren.

2.4.3 Ex vivo Analyse der Präsentation von endogen prozessiertem Antigen durch die DC aus den mediastinalen LK

In den vorhergehenden Untersuchungen wurde herausgefunden, dass die Proliferation adoptiv transferierter OVA-spezifischer T-Zellen in den mediastinalen LK nach CpG-Gabe reduziert ist. Von diesem Ergebnis war auf die verminderte Antigenpräsentation der pulmonalen DC in den mediastinalen LK CpG-behandelter Mäuse geschlossen worden. Um diese Erkenntnis zu bestätigen, sollte die Antigenpräsentation der DC aus den mediastinalen LK direkt analysiert werden. CpG-behandelte und nicht behandelte BL6-Mäuse wurden 24 h nach der Applikation des CpG mit OVA intranasal provoziert. Zur Kontrolle wurde unbehandelten Tieren PBS gegeben. Am folgenden Tag wurden die mediastinalen LK entnommen und die Zellen in den daraus aufbereiteten Suspensionen quantifiziert. Die DC wurden mittels Zellsortierung angereichert und anschließend in Proliferationsassays untersucht.

Einen Tag nach Antigen- und zwei Tage nach CpG-Gabe enthielten die mediastinalen LK der CpG-vorbehandelten und OVA-provozierten Tiere die dreifache Anzahl DC im Vergleich zu unbehandelten PBS-provozierten Kontrolltieren. In den Tieren, die OVA verabreicht aber keine CpG-Vorbehandlung bekommen hatten, war die DC-Zahl zwar gegenüber den Kontrolltieren erhöht, betrug jedoch nur die Hälfte der Anzahl an DC aus den Mäusen, die vorher mit CpG behandelt worden waren (Abb.2.19).

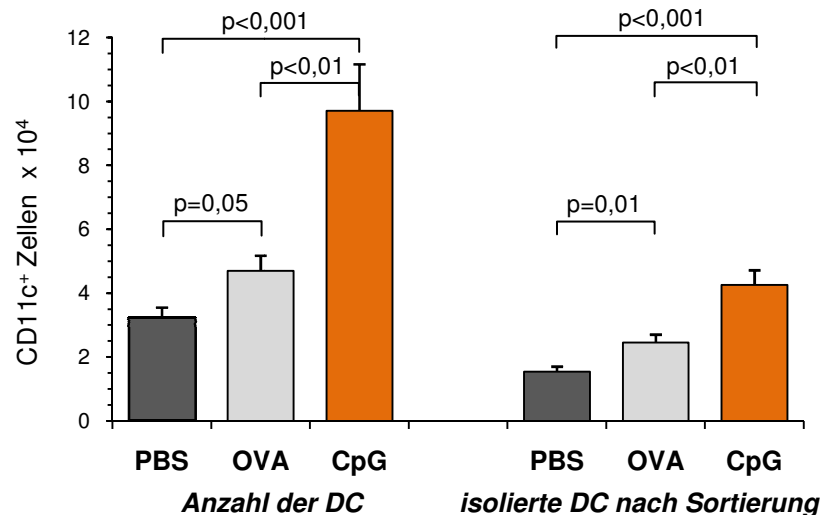


Abb.2.19 Anzahl DC in den mediastinalen LK nach Antigenprovokation. BL6-Mäuse wurden mit CpG behandelt (orange) oder unbehandelt gelassen (hellgrau) und 24 h später mit OVA intranasal provoziert. Unbehandelten Kontrolltieren wurde PBS verabreicht (dunkelgrau). Einen Tag nach der Antigengabe wurden die DC aus den mediastinalen LK isoliert. Die dargestellten Werte sind pro Maus berechnet und zeigen die Mittelwerte und SEM von 9 Experimenten mit je 2-3 Tieren pro Gruppe.

Die aus den mediastinalen LK isolierten DC wurden *in vitro* mit CFSE-gelabelten OVA-spezifischen T-Zellen, OT-II und OT-I, kokultiviert. Nach 60 h Kokultivierung wurde die Proliferation der T-Zellen analysiert. Erwartungsgemäß induzierten die DC aus den mediastinalen LK der PBS-provozierten Kontrolltiere keine wesentliche Proliferation der OVA-spezifischen T-Zellen (Abb.2.20). Die DC aus den mediastinalen LK von unbehandelten Tieren, die intranasal OVA verabreicht bekommen hatten, präsentierten dieses endogene OVA den T-Zellen und stimulierten sie somit zu proliferieren. DC von CpG vorbehandelten Tieren zeigten dagegen sowohl auf Klasse-II- als auch auf Klasse-I-Ebene keine klar erkennbare Präsentation des *in vivo* applizierten OVA.

Die OT-II und OT-I ließen sich generell durch die Präsentation des endogenen OVA *ex vivo* nur schwach zur Proliferation stimulieren. Um eine mangelnde Vitalität der mittels Zellsortierung angereicherten DC auszuschließen, wurden die DC vor der Kokultivierung mit OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid bzw. OVA₃₅₇₋₃₆₄-Peptid gepulst. Die Peptid beladenen DC von Tieren aus allen drei Gruppen stimulierten OT-II und OT-I in vergleichbarem Maße, womit ihre Funktionalität bewiesen wurde. DC aus den mediastinalen LK von CpG-vorbehandelten Mäusen zeigten dabei sogar eine höhere Kapazität zur T-Zellstimulation als die mediastinalen DC der anderen beiden Gruppen. Dieses Resultat korreliert mit der Tatsache, dass die MHC-II-Moleküle nach CpG-Behandlung hochreguliert sind (siehe 2.4.1).

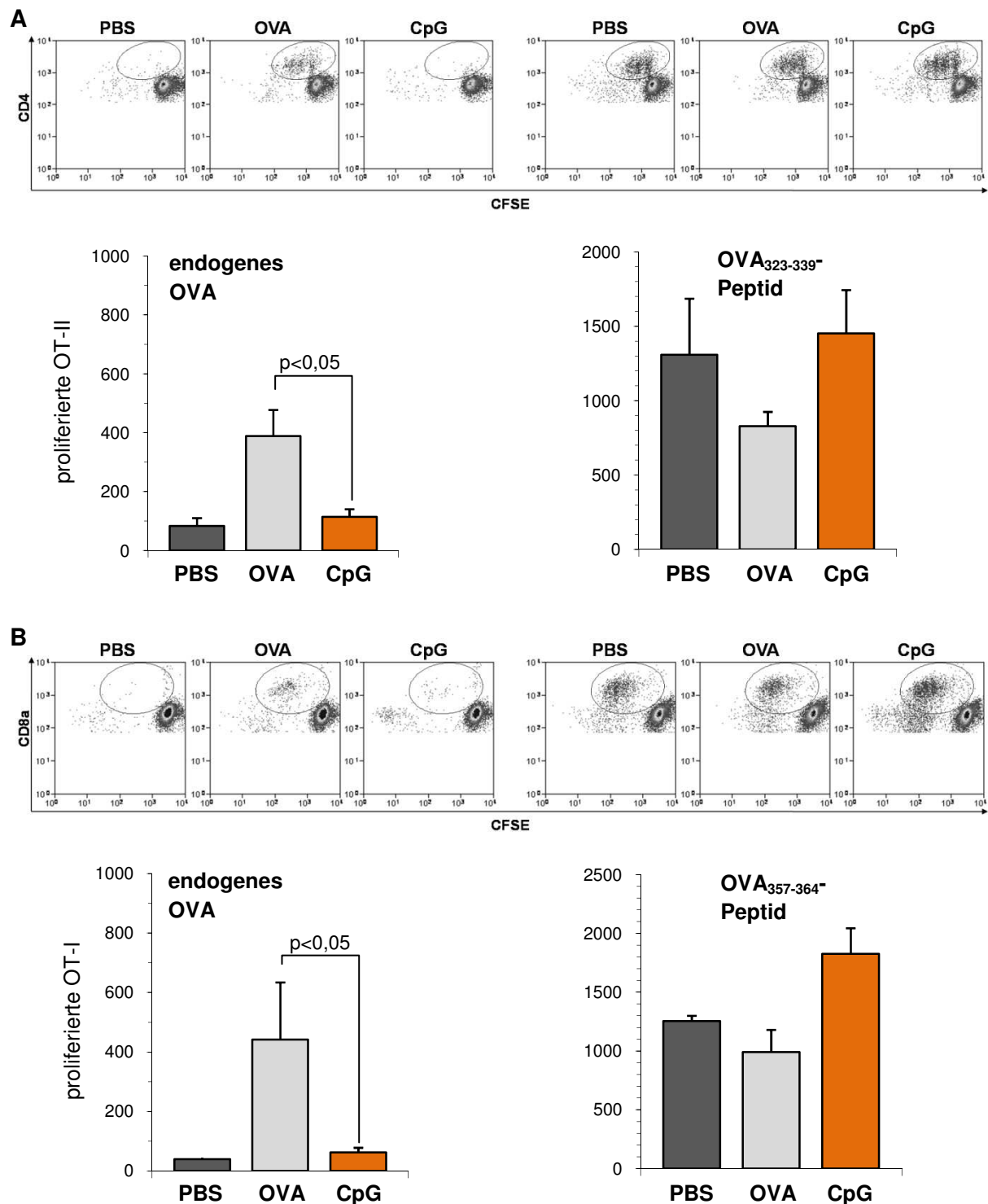


Abb.2.20 Beeinträchtigte Stimulation von OVA-spezifischen T-Zellen durch Antigen-erfahrene DC aus mediastinalen LK nach Vorbehandlung mit CpG. BL6-Mäuse wurden mit CpG behandelt (CpG) oder unbehandelt gelassen (OVA) und am folgenden Tag intranasal mit 25 µg OVA in PBS provoziert, unbehandelten Kontrolltieren wurde PBS instilliert (PBS). 24 h nach Antigengabe wurden die mediastinalen LK entnommen und die DC angereichert. Jeweils 10.000 DC wurden direkt (linke Seite) mit 50.000 CFSE-gelabelten OT-II (A) oder OT-I (B) 60h kokultiviert oder vor der Kokultivierung mit dem entsprechenden OVA-Peptid beladen (rechte Seite). Die Dot-Plots zeigen repräsentative Beispiele für die Proliferation der T-Zellen. Die proliferierten Zellen sind durch die ovalen Gates festgelegt. Ihre absoluten Zahlen sind in den Graphen unter den Dot-Plots als Mittelwerte mit SEM aus Daten von drei (OT-II) bzw. zwei (OT-I) unabhängigen Experimenten dargestellt.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Antigenpräsentation von 24 h nach CpG-Behandlung intranasal appliziertem OVA in den mediastinalen LK inhibiert war, obwohl die Anzahl der DC in den LK erhöht war und die Funktionalität der DC nicht eingeschränkt wurde.

2.4.4 Untersuchung der Antigenpräsentation isolierter pulmonaler DC *in vitro*

Die verminderte Antigenpräsentation von 24 h nach CpG-Behandlung intranasal appliziertem OVA in den mediastinalen LK war durch die Analyse der einen Tag nach der Antigenapplikation aus den mediastinalen LK isolierten DC gezeigt wurden. Vom Zeitpunkt der Antigenapplikation bis zur Präsentation des Antigens in den drainierenden LK muss das Antigen von den DC in der Lunge aufgenommen, prozessiert und zu den LK transportiert werden. In der Migrationsphase zu den drainierenden LK vollzieht sich dabei ein Prozess, in dem die maturierenden DC aus der Lunge ihre Antigenaufnahmefähigkeit verringern und in dem Maße die Präsentation der prozessierten Peptide über die MHC-Komplexe generieren. Der in der Verminderung der Antigenpräsentation der DC in den mediastinalen LK resultierende Effekt von CpG konnte daher schon seine Ursachen in der Wirkung von CpG auf die DC in der Lunge gehabt haben. Deshalb wurden in den folgenden Experimenten die DC aus den Lungen von CpG-behandelten und nicht behandelten BL6-Mäusen 24 h nach der intranasalen CpG-Gabe isoliert und dem Antigen *in vitro* exponiert. Zum Vergleich wurden ebenso die alveolären Makrophagen isoliert und mituntersucht. Die Zellen der beiden sortierten reinen Populationen wurden mit OVA-Protein, dem MHC-Klasse-II-restriktiven OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid oder ohne Antigen inkubiert. Im anschließenden Proliferationsassay wurde dann die Fähigkeit der gepulsten Zellen, OT-II zu stimulieren, untersucht.

Die Makrophagen waren im Gegensatz zu den DC kaum in der Lage, die OT-II direkt zu stimulieren (Abb.2.21 unten). Dieses Ergebnis ist bedeutend für die Interpretation der Daten, die aus den Untersuchungen der Lungen-DC ermittelt wurden, denn durch die Art der Aufreinigung und die Definition der Population der Lungen-DC (siehe 2.3.1) war nicht vollständig auszuschließen, dass Makrophagen die angereicherte DC-Population verunreinigen. Hiermit konnte behauptet werden, dass die durch die isolierten Zellen aus der Lunge induzierte T-Zellproliferation fast ausschließlich auf die DC zurückzuführen war.

Durch die DC aus der Lunge von unbehandelten Mäusen (wt) wurden die OT-II im allgemeinen relativ schwach stimuliert. Dabei proliferierten vergleichbare Anzahlen von OT-II, wenn die T-Zellen mit DC inkubiert wurden, die OVA prozessieren mussten, als auch nach der Inkubation mit DC, die nur die MHC-II-Moleküle mit Peptid zu beladen hatten (Abb.2.21 oben). Die DC aus der Lunge von CpG-behandelten Tieren, die mit OVA₃₂₃₋₃₃₉-

Peptid gepulst worden waren, induzierten eine viermal so große Anzahl proliferierter T-Zellen im Vergleich zu den mit Peptid-gepulsten DC aus unbehandelten Tieren. Dieses Potential der Lungen-DC aus CpG-behandelten Tieren konnte nicht ausgeschöpft werden, wenn diese DC prozessiertes OVA-Protein präsentierten. Dennoch wurden mit den OVA-gepulsten DC aus CpG-behandelten Tieren eine größere Anzahl OT-II zur Proliferation angeregt als durch OVA-gepulste DC aus wt-Tieren. Demzufolge musste festgestellt werden, dass CpG in den DC der Lunge nicht die Antigenpräsentation von nachfolgend appliziertem OVA inhibiert.

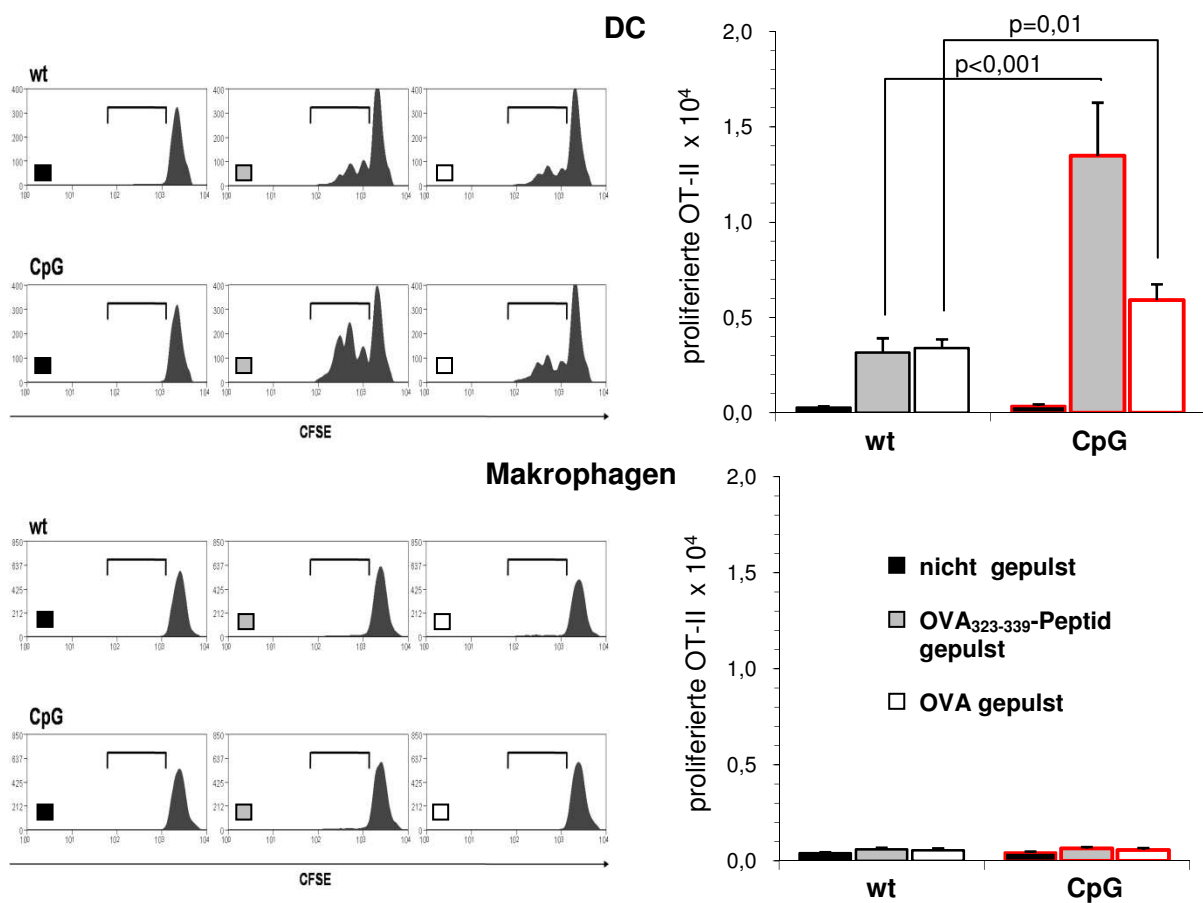


Abb.2.21 Antigenpräsentation von nach CpG-Behandlung aus der Lunge isolierten Zellen. BL6-Mäusen wurde 24 h vor der Entnahme der Lungen 20 nmol CpG intranasal appliziert (CpG) oder die Tiere wurden unbehandelt gelassen (wt). Die DC und Makrophagen wurden nach Dichtezentrifugation des verdauten Lungengewebes mit Hilfe der Zellsortierung isoliert. Je 10.000 Zellen wurden ohne Antigen (linke Histogramme, schwarze Balken), mit 1 µg/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (mittlere Histogramme, hellgraue Balken), oder 100 µg/ml OVA-Protein (rechte Histogramme, weiße Balken) gepulst und 60 h mit je 50.000 CFSE-gelabelten OT-II kokultiviert. Die Proliferation der OT-II wurde mittels FACS-Analyse ausgewertet. Auf der linken Seite sind repräsentative Beispiele für die Proliferation der OT-II abgebildet. In den Graphiken werden die Anzahlen der proliferierten OT-II darstellt. Für die DC sind Mittelwerte und SEM von Daten aus drei Experimenten mit drei Mäusen pro Gruppe gezeigt. Die Werte der Makrophagen resultieren aus zwei unabhängigen Experimenten.

Von den CpG-behandelten und nicht behandelten BL6-Mäusen wurden 24 h nach der intranasalen CpG-Applikation ebenfalls die mediastinalen LK entnommen. Die aus den mediastinalen LK isolierten DC wurden genauso wie die DC aus der Lunge mit OVA, dem MHC-Klasse-II-restriktiven OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid oder nicht gepulst und im anschließenden Proliferationsassay auf ihre Fähigkeit OT-II zu stimulieren untersucht. Ähnlich wie die Lungen-DC induzierten die DC aus den mediastinalen LK der CpG-behandelten Tiere, die mit OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid-gepulst worden waren, wesentlich mehr proliferierte T-Zellen im Vergleich zu den mit Peptid-gepulsten DC aus unbehandelten Tieren. Nur fiel hier die Differenz in der Anzahl der proliferierten OT2 mit annähernd dem Siebenfachen deutlich gravierender aus. Dieses Ergebnis sprach dafür, dass die DC in den drainierenden LK der CpG-behandelten Tiere noch stärker als die DC in der Lunge MHC-II-Moleküle hochreguliert hatten und daher mehr Peptid-Moleküle über die MHC-II-Komplexe präsentieren konnten (Abb.2.22). Nach Inkubation mit OVA-Protein stimulierten diese DC jedoch nur ähnlich geringe Mengen OT-II wie die DC aus den wt-Tieren. Allerdings war auch bei den DC aus den mediastinalen LK der 24 h zuvor CpG instillierten Mäuse keine Verschlechterung der Antigenpräsentation zu erkennen.

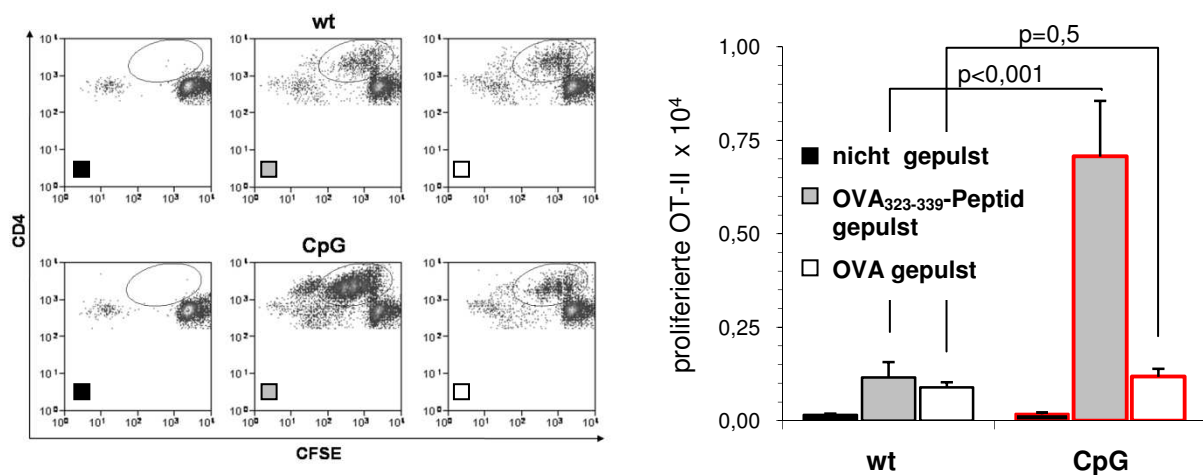


Abb.2.22 Antigenpräsentation von nach CpG-Behandlung aus mediastinalen LK isolierten DC.

BL6-Mäusen wurde 24 h vor der Entnahme der mediastinalen LK 20 nmol CpG intranasal appliziert (CpG) oder die Tiere wurden unbehandelt gelassen (wt). CD11c⁺-Zellen wurden aus den Zellsuspensionen der LK durch Zellsortierung angereichert. Je 10.000 Zellen wurden ohne Antigen (linke Bilder, schwarze Balken), mit 1 µg/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (mittlere Bilder, hellgraue Balken), oder 100 µg/ml OVA-Protein (rechte Bilder, weiße Balken) gepulst und 60 h mit je 50.000 CFSE-gelabelten OT-II kokultiviert. Die Proliferation der OT-II wurde mittels FACS-Analyse ausgewertet. Auf der linken Seite sind repräsentative Beispiele für die Proliferation der OT-II abgebildet. In den Graphiken werden die Anzahlen der proliferierten OT-II darstellt. Es sind die Mittelwerte und SEM von Daten aus vier Experimenten mit zwei bis drei Mäusen pro Gruppe gezeigt.

2.4.5 Untersuchung der Antigenpräsentation isolierter DC aus der Lunge von sensibilisierten Mäusen

Die *in vitro* Untersuchung von DC aus der Lunge von 24 h zuvor CpG-behandelten und nicht behandelten BL6-Mäusen hatte ergeben, dass CpG in den Lungen-DC nicht die Antigenpräsentation von nachfolgend appliziertem OVA inhibiert. Die für diese Untersuchung isolierten DC stammten aus den Lungen von naiven Mäusen. Bei der Generierung der allergischen Entzündungsreaktion in den hier angewendeten Asthmamodellen (siehe 2.1 und 2.2), in denen die inhibierende Wirkung von CpG gezeigt worden war, hatte sich durch die Sensibilisierung der Tiere zum Zeitpunkt der Provokation mit OVA ein verändertes Cytokin- und Chemokinmilieu ausgebildet. Es stellte sich die Frage, ob der Effekt von CpG in diesem Zusammenhang zu der erwarteten Herunterregulation der Antigenpräsentation führen würde. Dazu wurden BALB/c-Mäuse an Tag 1, 14 und 21 mit OVA und Alum in PBS mittels intraperitonealer Injektion sensibilisiert. Ein bis zwei Wochen später wurde den sensibilisierten Mäusen intranasal CpG instilliert oder keine Behandlung zuteil. Am folgenden Tag wurden die Tiere intranasal mit OVA provoziert und zwei Stunden danach die DC aus den Lungen isoliert. Die Antigen-erfahrenen DC wurden dann *in vitro* zur Stimulation von DO11.10 eingesetzt. Zum Vergleich wurden nicht sensibilisierte Tiere ebenfalls intranasal mit OVA provoziert und die zwei Stunden später isolierten Lungen-DC mituntersucht.

Die DC aus den Lungen der sensibilisierten und OVA-exponierten Mäuse präsentierten das *in vivo* aufgenommene Antigen unabhängig von der Vorbehandlung mit CpG in deutlich stärkerem Maße als die DC aus nicht sensibilisierten Tieren. Das zeigte sich in der 9fach induzierten Anzahl proliferierter DO11.10 (Abb.2.23B, endogen). Die durch die Sensibilisierung veränderten Bedingungen in der Lunge hatten demzufolge die Kapazität der DC, endogenes Antigen zu präsentieren, erhöht. Diese Kapazität konnte durch die Vorbehandlung mit CpG nicht herabgesetzt werden. Wurden die Antigen-erfahrenen DC *in vitro* mit OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid oder OVA-Protein inkubiert, wiesen die DC aus sensibilisierten Mäusen gegenüber den DC aus nicht sensibilisierten Tieren keine gesteigerte Fähigkeit zur Antigenpräsentation auf. Im Vergleich dazu stimulierten DC aus den Lungen sensibilisierter Tiere, die mit CpG vorbehandelt waren, viermal besser DO11.10, wenn sie mit OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid gepulst waren und um das 1,5fache mehr T-Zellen nach Inkubation mit OVA-Protein. Es stellte sich, betreffs der Resultate für OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid und OVA-Protein gepulste DC, ein ähnliches Muster proliferierter DO11.10 wie bei der Analyse pulmonaler DC aus naiven Mäusen für OT-II dar (vergleiche mit Abb.2.21). Somit ergab sich auch aus dem Ergebnis der Untersuchung der Lungen-DC aus sensibilisierten Mäusen, dass CpG in DC der Lunge nicht die Antigenpräsentation von nachfolgend appliziertem OVA inhibiert.

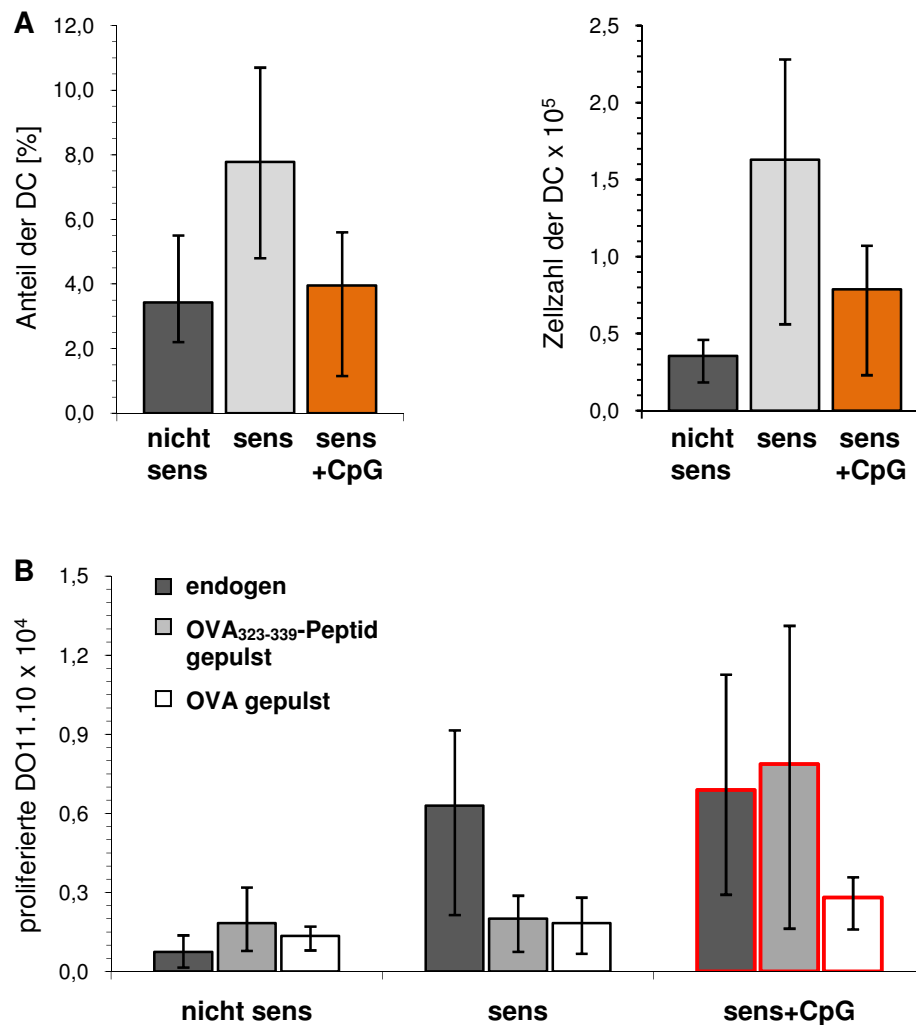


Abb.2.23 Der Effekt der CpG-Behandlung auf die DC in der Lunge von sensibilisierten Mäusen. BALB/c-Mäuse wurden an Tag 1, 14 und 21 mit 10 µg OVA in PBS an 1,5 mg Alum adsorbiert i.p. sensibilisiert. Nach Tag 28 wurde den Mäusen intranasal CpG instilliert (sens+CpG) oder keine Behandlung zugeführt (sens). Am darauffolgenden Tag wurden die Tiere intranasal mit 10-20 µg OVA in PBS provoziert. Zum Vergleich wurden nicht sensibilisierte Tiere ebenfalls intranasal mit OVA provoziert (nicht sens). Zwei Stunden nach der Antigenprovokation wurden die DC aus den gepoolten Lungen, drei Tiere pro Gruppe, isoliert. A) Prozentuale Anteile und absolute Zellzahlen der DC, berechnet pro Maus. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Range von drei unabhängigen Experimenten. B) Funktionelle Analyse der DC. Je 10.000 Zellen wurden ohne zusätzliches Antigen (dunkelgraue Balken), mit 1 µg/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (hellgraue Balken), oder 100 µg/ml OVA-Protein (weiße Balken) gepulst und 60 h mit je 50.000 CFSE-gelabelten DO11.10 kokultiviert. Die Proliferation der DO11.10 wurde mittels FACS-Analyse ausgewertet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± Range von zwei unabhängigen Experimenten.

Ein Effekt der CpG-Behandlung zeigte sich überraschenderweise in der Anzahl der DC (Abb.2.23A). Zwei Stunden nach der Antigenprovokation enthielten die Lungen von sensibilisierten Mäusen prozentual doppelt so viele DC wie die Lungen von nicht sensibilisierten Tieren. Die absolute Zahl der DC war sogar um mehr als das vierfache

erhöht. Durch die Vorbehandlung mit CpG wurde diese durch die Antigenprovokation induzierte Zunahme der Lungen-DC unterdrückt. Denn sowohl der prozentuale Anteil als auch die Zellzahl der DC waren in den sensibilisierten Tieren, die mit CpG behandelt worden waren, um die Hälfte reduziert.

2.4.6 Untersuchung des Migrationsverhaltens pulmonaler DC nach CpG-Gabe

Die Ergebnisse der Untersuchung der Antigenpräsentation hatten zu erkennen gegeben, dass die Präsentation von 24 h nach CpG-Instillation intranasal verabreichtem OVA in den drainierenden LK inhibiert war. Diese Inhibition konnte nicht wie erwartet auf die Herunterregulation der Antigenpräsentation in den DC aus der Lunge als auch den mediastinalen LK zurückgeführt werden. Es konnte möglich sein, dass die Migration der OVA-präsentierenden DC aus der Lunge in die drainierenden LK durch CpG negativ beeinflusst wurde und deshalb keine antigenpräsentierenden DC in die mediastinalen LK gelangten, um dort OVA-spezifische T-Zellen zu stimulieren.

Um die Migration der DC aus der Lunge in die drainierenden LK zu verfolgen, wurde einen Tag zuvor CpG-behandelten oder unbehandelten BL6-Mäusen der in Zellen eindringende fluoreszierende Farbstoff CFSE intranasal verabreicht. In der Literatur ist bereits gezeigt worden, dass die Instillation von CFSE über die nasale Route alle in der Lunge residierenden Zelltypen, und somit auch die DC, *in vivo* markiert [77]. Zur Kontrolle wurde CCR7^{-/-} Mäusen, in denen aufgrund des fehlenden CCR7-Rezeptors keine DC-Migration in die LK stattfindet [40], CFSE appliziert. Ebenso wurde BL6-Mäusen kurz vor der CpG-Behandlung CFSE instilliert, da gezeigt worden war, dass zu dem Zeitpunkt der CpG-Instillation selbst ein Migrationsschub der DC ausgelöst wird [77]. Den Tieren aller Gruppen wurden 18 h nach der CFSE-Instillation die mediastinalen LK entnommen und die CFSE-Markierung der DC beurteilt.

In unbehandelten Tieren waren 15% der CD11c⁺ Zellen aus den mediastinalen LK CFSE⁺. In 24 h vor der CFSE-Applikation mit CpG behandelten Tieren konnte nur noch ein Anteil von 1,3% CD11c⁺ CFSE⁺ Zellen nachgewiesen werden. Damit war der Anteil der CFSE-gelabelten DC in den mediastinalen LK durch die Vorbehandlung mit CpG annähernd auf das Niveau von 0,5% der als Negativkontrolle eingesetzten CCR7^{-/-} Mäuse gesunken (Abb.2.24A). In den unmittelbar nach CFSE-Instillation mit CpG behandelten Tieren waren 9% der DC CFSE gelabelt. Das Ergebnis für die prozentualen Anteile der CD11c⁺ CFSE⁺ Zellen in den mediastinalen LK der Tiere aller vier Gruppen spiegelte sich in den absoluten Zahlen dieser Zellen wieder (Abb.2.24B). Aus den Daten konnte geschlussfolgert werden, dass die 24stündige Vorbehandlung mit intranasalem CpG einen inhibitorischen Effekt auf

die nachfolgende Migration der pulmonalen DC hatte, der direkt nach der CpG-Applikation noch nicht ausgeprägt war.

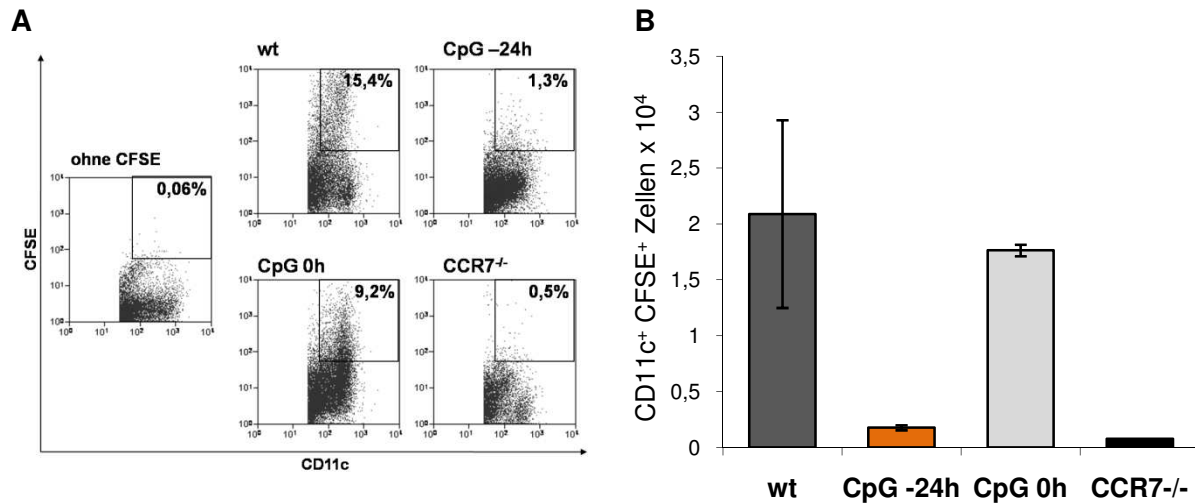


Abb.2.24 Analyse der Migration von CFSE-gelabelten pulmonalen DC nach CpG-Behandlung. Unbehandelten (wt) oder 24 h zuvor intranasal mit 20 nmol CpG behandelten BL6-Mäusen (CpG 24h) sowie zur Kontrolle CCR7 defizienten Mäusen (CCR7^{-/-}) wurden 50 µl 5 mmol CFSE instilliert. Ebenso wurden BL6-Mäuse unmittelbar nach der CFSE-Instillation mit CpG behandelt (CpG 0h). 18 h nach Instillation des CFSE wurden den Tieren (drei pro Gruppe) die mediastinalen LK entnommen, gepoolt und die Zellsuspensionen mittels FACS-Analyse ausgewertet. In den Dot-Plots ist die CFSE-Markierung innerhalb der CD11c⁺-Population dargestellt (A), die Graphik repräsentiert die Mittelwerte mit den korrespondierenden Bereichen der absoluten Zahlen der CD11c⁺ CFSE⁺Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten (B).

Um die Inhibition der Migration antigenpräsentierender pulmonaler DC nach Vorbehandlung mit CpG näher der Situation im Asthmodell entsprechend darzustellen, wurden den behandelten oder unbehandelten BL6-Mäusen 24 h nach der intranasalen CpG-Gabe gelbgrüne 0,05 µm große Mikrosphäre-Beads instilliert. Diese fluoreszierenden Mikrokugeln werden, ähnlich wie das Antigen OVA, von den DC ohne aktive Phagozytose aufgenommen. 18 h nach Applikation der Beads wurden neben den DC aus den mediastinalen LK auch die DC aus der Lunge analysiert. Wie in Abbildung 2.25A zusehen ist, wurden die intranasal verabreichten Beads sowohl in unbehandelten Tieren als auch CpG-vorbehandelten Tieren von den Lungen-DC in starkem Maße aufgenommen, wie an der hohen Intensität der gelbgrünen Fluoreszenz zu erkennen ist. Im Vergleich zu den Lungen-DC wiesen die Alveolarmakrophagen eine gegenüber ihrer Autofluoreszenz nur leicht gesteigerte Fluoreszenzintensität auf. Dies zeigte, dass die Makrophagen ebenso die Beads aufnehmen konnten, allerdings nicht in dem Vermögen wie die DC.

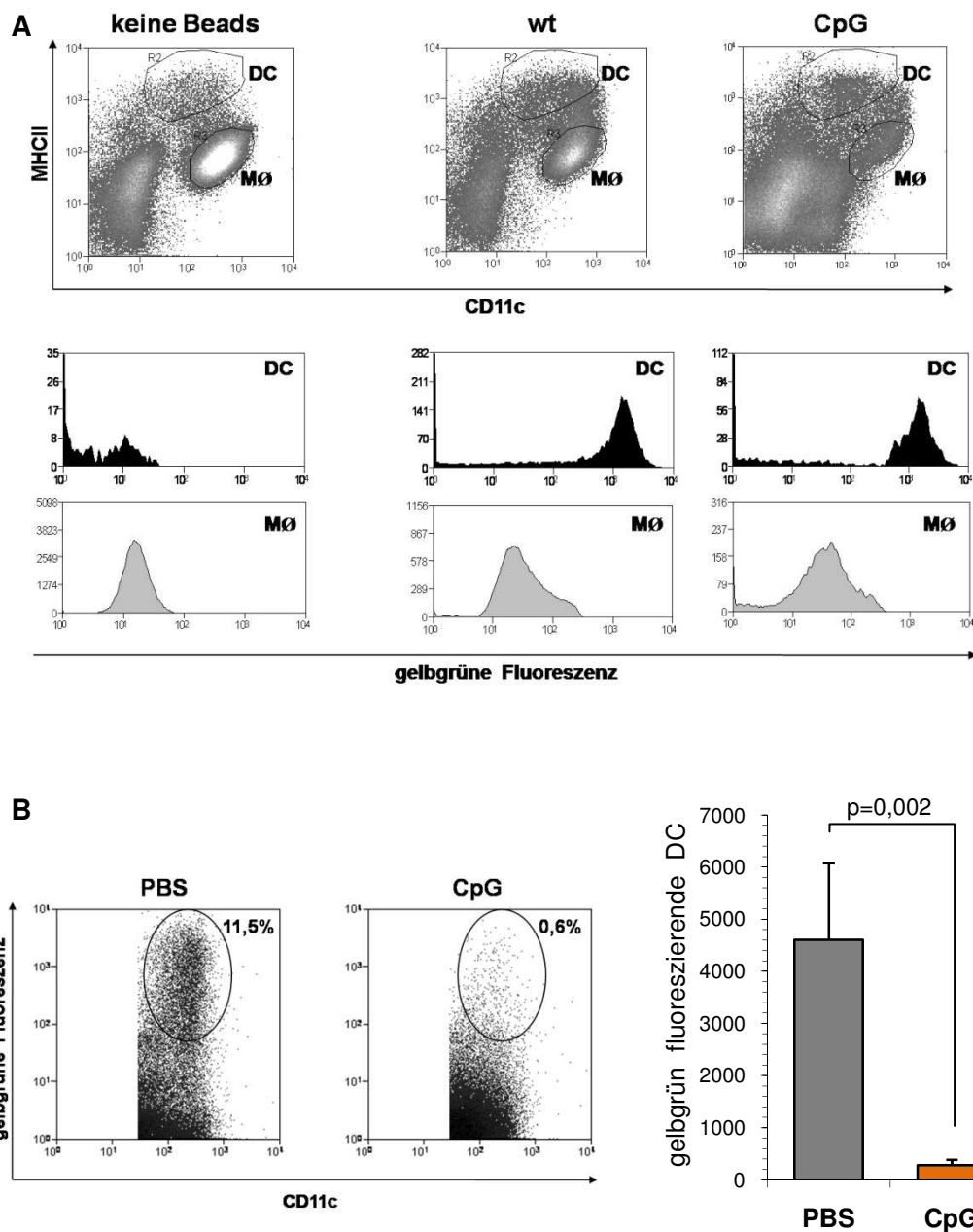


Abb.2.25 Inhibition der Migration von Mikrosphäre-Beads-tragenden Lungen-DC nach Vorbehandlung mit CpG. BL6-Mäuse wurden intranasal mit 50 μ l PBS oder 20 nmol CpG behandelt. 24 h danach wurden den Tieren 5×10^{12} 0,05 μ m große gelbgrüne Mikrosphäre-Beads instilliert und nach weiteren 24 h die Lungen und mediastinalen LK untersucht. A) Analyse der Lungen-DC und der alveolären Makrophagen. Die Histogramme repräsentieren die durch die Gates in den Dot-Plots festgelegten Zellen. B) Analyse der DC aus den mediastinalen LK. Die Dot-Plots (linke Seite) stellen repräsentative Beispiele für die prozentualen Anteile der Beads-tragenden CD11c⁺ Zellen dar. In der quantitativen graphischen Darstellung (rechte Seite) sind die Mittelwerte und SEM von zwei unabhängigen Experimenten mit drei Tieren pro Gruppe zu sehen.

Bei der Analyse der DC aus den mediastinalen LK fanden sich in den unbehandelten Mäusen durchschnittlich 4.600 fluoreszierende Mikrosphere-Beads tragende DC, die 12% der CD11c⁺ Zellen ausmachten, wieder (Abb.2.25B). In den LK der CpG-vorbehandelten Mäuse konnte nur eine geringe Anzahl von 285 gelbgrün fluoreszierenden DC, die im Mittel 1% der CD11c⁺ Population darstellten, detektiert werden. In Bezug auf den Zeitpunkt der Provokation mit OVA im Rahmen der Ausbildung der asthmatischen Entzündungsreaktion wurde mit diesen Resultaten gezeigt, dass die Antigenaufnahme in der Lunge 24 h nach der CpG-Behandlung nicht restringiert, die Migration der DC und demzufolge die Präsentation des Antigens in den drainierenden LK jedoch inhibiert war.

Die beiden vorangehenden experimentellen Ansätze zur Untersuchung der Migration der DC nach CpG-Gabe zielten direkt auf die Analyse der endogenen pulmonalen DC. Nun sollte untersucht werden, inwiefern transferierte DC in CpG-vorbehandelten Mäusen in ihrem Migrationsverhalten eingeschränkt werden. Dazu wurden aus Knochenmark (*engl.: bone marrow*, BM) von Spendertieren *in vitro* generierte DC (BM-DC) mit CFSE markiert und in 24 h zuvor mit PBS oder CpG behandelte BL6-Mäuse intranasal transferiert. Am darauffolgenden Tag wurden den Tieren die mediastinalen LK entnommen und die CFSE-Markierung der CD11c⁺ Zellen analysiert.

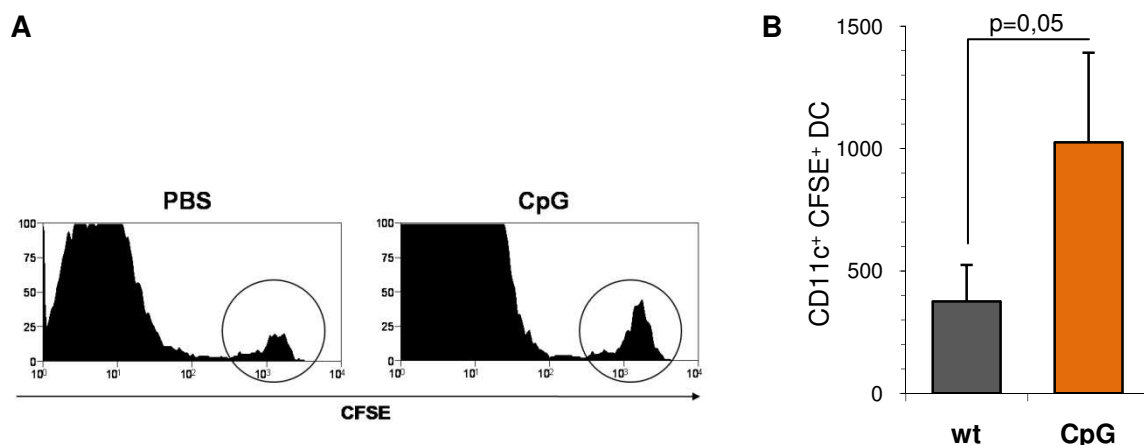


Abb.2.26 Die Migration von intranasal transferierten BM-DC ist nach CpG-Behandlung nicht inhibiert. 4-5 x 10⁵ aus Knochenmark (*engl. bone marrow*, BM) generierte und *in vitro* CFSE-gelabelte DC (BM-DC) wurden intranasal in 24 h zuvor mit 50 µl PBS oder 20 nmol CpG behandelte BL6-Mäuse transferiert. Am darauffolgenden Tag wurden die mediastinalen LK entnommen und die CD11c⁺ Zellen mittels FACS-Analyse ausgewertet. A) Repräsentative Bilder der in den LK wiedergefundenen CFSE-gelabelten BM-DC. B) Quantitative Darstellung der CFSE-gelabelten CD11c⁺ Zellen. Die Daten sind Mittelwerte und SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit 3-4 Tieren pro Gruppe.

Sowohl in den mediastinalen LK der PBS- als auch der CpG-behandelten Mäuse wurden CFSE-gelabelte BM-DC wiedergefunden, die sich deutlich als eigenständige Population von den anderen CD11c⁺ Zellen abgrenzen ließen (Abb.2.26). Quantitativ überstieg die Anzahl der in den LK der CpG-behandelten Mäuse wiedergefundenen BM-DC sogar die Anzahl derer in den LK der PBS-behandelten Tiere um mehr als das Doppelte. Somit wurde die Migration intranasal transferierter BM-DC in die mediastinalen LK durch die Vorbehandlung mit CpG nicht inhibiert. Ebenso war aus dem Ergebnis zu schließen, dass das 24 h vor dem Transfer der BM-DC applizierte CpG keinen Effekt auf das chemotaktische Milieu in der Lunge und den drainierenden LK zu haben schien, durch den die transferierten BM-DC von der Migration abgehalten würden.

2.4.7 Restauration der Antigenpräsentation in den mediastinalen LK

Die aufgestellte Hypothese war, dass die inhibitorische Wirkung von CpG bei der Entstehung allergischer Atemwegsentzündungen in der Aktivierung der pulmonalen DC und der daraus resultierenden Verhinderung der Antigenpräsentation nachfolgend verabreichter Antigene begründet liegt. Die bisherigen Ergebnisse bestätigten die Hypothese insofern, dass nach intranasaler Provokation mit OVA die Proliferation antigenspezifischer OT-II und OT-I in den mediastinalen LK von CpG-behandelten BL6-Mäusen stark reduziert war. Allerdings konnte in der direkten Analyse der Lungen-DC aus CpG-behandelten Tieren, die nachweisbar Aktivierungsmarker hochreguliert hatten, keine Verschlechterung der Präsentation von OVA festgestellt werden. Dafür wurde gezeigt, dass die Migration der DC aus der Lunge in die drainierenden LK 24 h nach CpG-Instillation inhibiert war. Zu diesem Zeitpunkt intranasal transferierte BM-DC wurden dagegen nicht in ihrer Migrationsfähigkeit eingeschränkt. Es sollte daher möglich sein, die nach CpG-Behandlung reduzierte Antigenpräsentation in den mediastinalen LK durch den intranasalen Transfer von BM-DC wiederherzustellen.

Wie in dem unter 2.4.2 durchgeführten Experiment wurden CpG-behandelte oder nicht behandelte BL6-Mäuse 24 h nach der Applikation inhalativ mit dem Antigen OVA provoziert. Simultan wurden den Tieren naive CFSE-markierte OT-II intravenös transferiert. Einer weiteren Gruppe CpG-behandelter Mäuse wurden zusätzlich direkt vor der Antigenprovokation *in vitro* generierte BM-DC intranasal transferiert. Drei Tage nach der Antigenprovokation wurden die transferierten OT-II aus den mediastinalen LK wiedergewonnen und ihre Proliferation analysiert.

Wie bereits gezeigt (2.4.2) wurde durch die Vorbehandlung mit CpG die Präsentation von OVA in den mediastinalen LK inhibiert, was die reduzierte Proliferation der transferierten OT-II zur Folge hatte. In den CpG-behandelten Mäusen, denen BM-DC instilliert worden waren, konnte die Proliferation der OT-II rekonstituiert werden (Abb.2.27). Durch den intranasalen Transfer von BM-DC wurde damit nicht nur die inhibierte Migration der DC aus der Lunge kompensiert, sondern auch die Antigenpräsentation in den drainierenden LK wiederhergestellt.

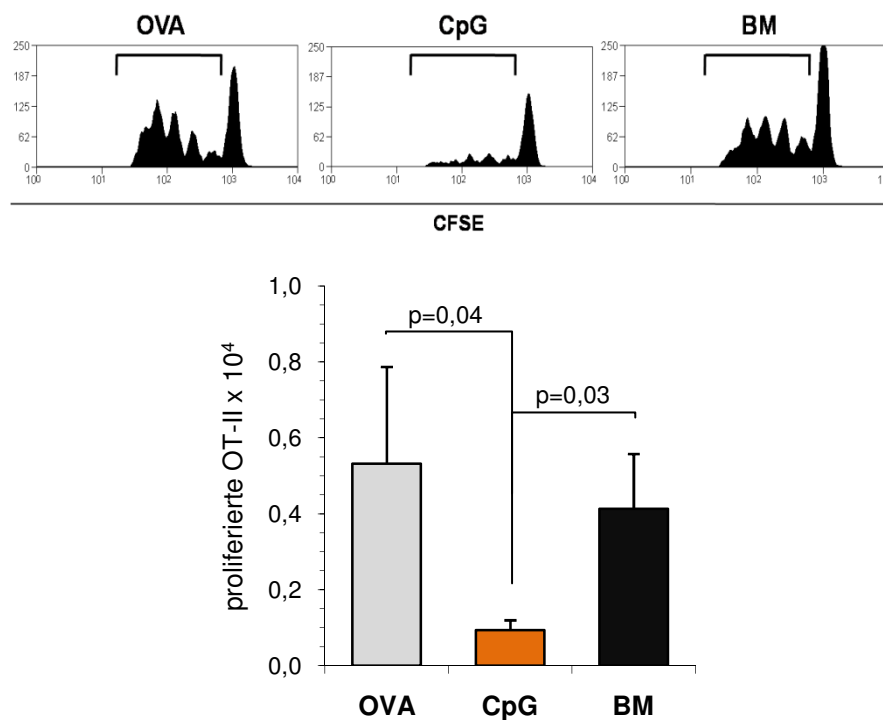


Abb.2.27 Restauration der Proliferation von adoptiv transferierten OT-II in CpG-vorbehandelten Mäusen durch Instillation von BM-DC. BL6-Mäuse wurden intranasal mit CpG behandelt (CpG) oder unbehandelt gelassen (OVA). Den Tieren wurden $2-3 \times 10^6$ CFSE-gelabelte OT-II i.v. transferiert, gefolgt von der inhalativen Provokation mit 1% OVA in PBS, die am nächsten Tag wiederholt wurde. Einer Gruppe CpG-behandelter Mäuse wurden direkt vor der OVA-Exposition $4-5 \times 10^5$ BM-DC intranasal transferiert (BM). 60 h nach der ersten Antigenprovokation wurden die mediastinalen LK entnommen und die Proliferation der wieder gewonnenen OT-II mittels FACS-Analyse ausgewertet. Die Histogramme beschreiben repräsentative Bilder der Proliferation der OT-II. In der Graphik sind die proliferierten OT-II quantitativ dargestellt. Die Daten zeigen die Mittelwerte und SEM der Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit 2-3 Tieren pro Gruppe.

2.4.8 Analyse der Expression des Chemokinrezeptor 7 und seiner Liganden

Die Untersuchung des Migrationsverhaltens pulmonaler DC hatte ergeben, dass die Migration der DC aus der Lunge in die drainierenden LK 24 h nach intranasaler CpG-Applikation inhibiert war. Für die Migration in die drainierenden LK benötigen die DC den Chemokinrezeptor-7 (CCR7), der nach der Reifung der Zellen auf den Lungen-DC exprimiert wird [52]. Durch die Interaktion des CCR7 mit seinen Liganden Chemokin-21 (CCL21) und Chemokin-19 (CCL19) werden die Lungen-DC über die afferenten Lymphgefäße in die mediastinalen LK geleitet [33]. Es ist gezeigt worden, dass CCL19 und CCL21 während der Immunantwort auf virale und bakterielle Infektionen, unter anderem auch mit CpG-Motiven enthaltenden Virus-ähnlichen Partikeln, herunterreguliert werden [82]. Dieser Effekt könnte ebenso durch die intranasale CpG-Gabe ausgelöst werden, möglicherweise beeinflusst CpG auch die Expression des CCR7.

Um zu untersuchen, ob darin ein Mechanismus für die Inhibition der Migration der Lungen-DC liegt, wurde BL6-Mäusen intranasal CpG appliziert. Einen Tag später wurden die DC aus der Lunge, den mediastinalen sowie inguinalen LK hinsichtlich ihrer Expression von CCR7 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Innerhalb der DC aus der Lunge trugen nur durchschnittlich 0,4 - 1,3% der Zellen den Rezeptor auf der Zelloberfläche. Dabei war kein Unterschied in den absoluten Zahlen CCR7-exprimierender DC aus den Lungen von unbehandelten und CpG-behandelten Tieren zu erkennen (Abb.2.28A). Innerhalb der DC in den mediastinalen LK verringerte sich der prozentuale Anteil der CCR7-exprimierenden Zellen nach CpG-Behandlung um mehr als die Hälfte, absolut steigt die Anzahl CCR7⁺-DC jedoch um das zwei- bis dreifache an (Abb.2.28B). Im Vergleich dazu war sowohl prozentual als auch absolut kein Unterschied in der CCR7-Expression auf den DC aus den inguinalen LK festzustellen (Abb.2.28C).

Zur Analyse der Expression der Chemokine CCL19 und CCL21 wurde in einem weiteren Experiment 24 h nach der CpG-Applikation die RNA aus den mediastinalen LK der Tiere isoliert. Durch reverse Transkription der mRNA in cDNA und anschließender in Echtzeit durchgeführter Polymerase-Kettenreaktion (*engl.: real-time polymerase chain reaction*, RT-PCR) wurden die mRNA-Level der Chemokine quantifiziert. Einen Tag nach der CpG-Behandlung war der Gehalt an CCL21-mRNA in den mediastinalen LK erheblich reduziert. In den behandelten Tieren wurde 75% weniger mRNA im Vergleich zu den unbehandelten Tieren nachgewiesen (Abb.2.29). Von der mRNA des Chemokin CCL19 wurden durchschnittlich 25% weniger detektiert. Die Graphik lässt eine fallende Tendenz erkennen, obwohl das Ergebnis nicht signifikant war.

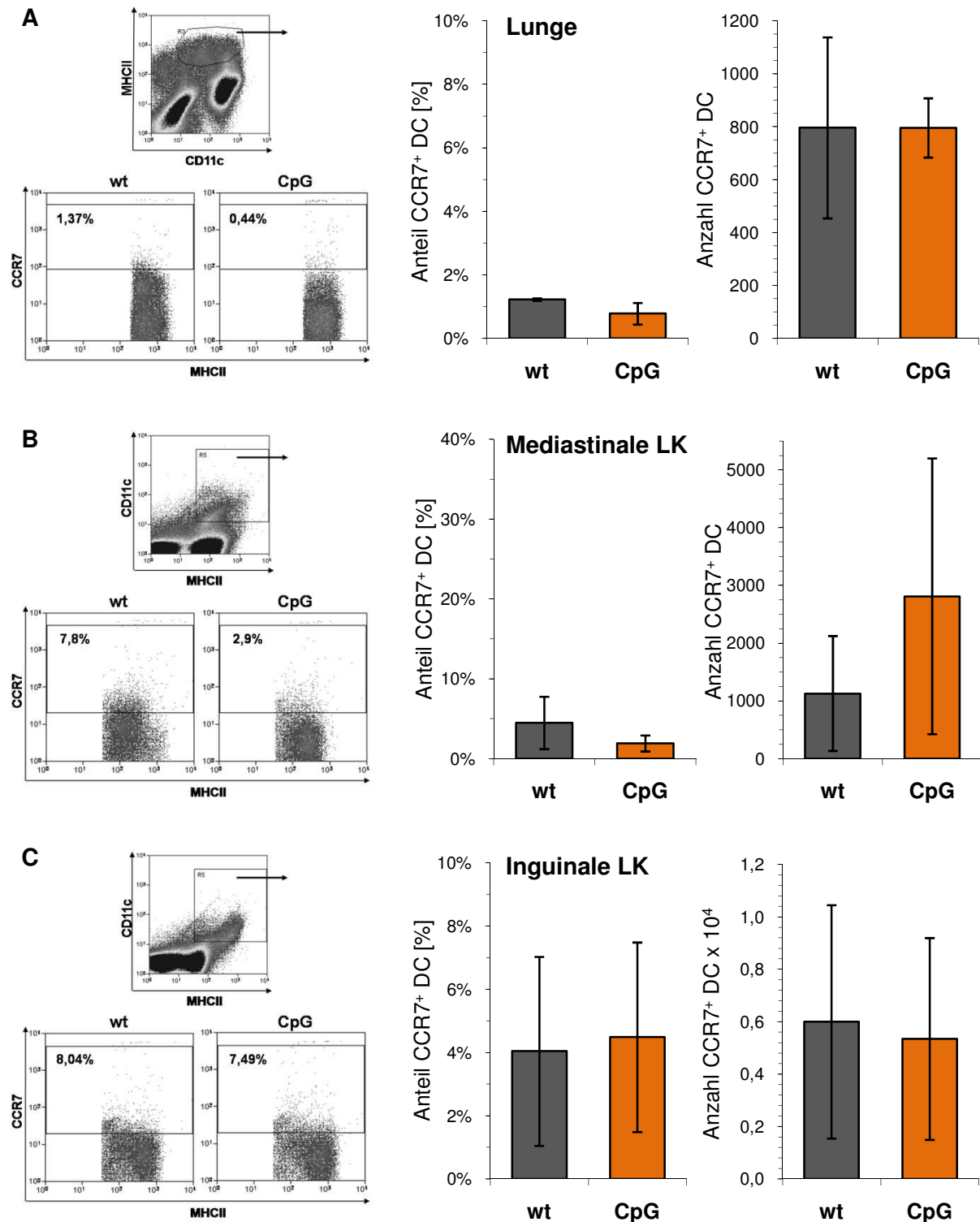


Abb.2.28 Expression von CCR7 auf DC nach CpG-Behandlung. BL6-Mäusen wurde 20 nmol CpG intranasal appliziert (CpG), Vergleichstiere wurden unbehandelt gelassen (wt). Am folgenden Tag wurden die isolierten DC aus der Lunge (A) sowie die Zellsuspensionen der mediastinalen (B) und inguinalen LK (C) mit CD11c-FITC, MHC-II-PE und CD197(CCR7)-PECy5 gefärbt und mittels FACS-Analyse, die durch die Dot-Plots repräsentiert wird, ausgewertet. Die in den Graphiken dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die CD11c⁺/MHC-II⁺-Zellen und zeigen den prozentualen Anteil (Mitte) und die absoluten Zahlen (rechts) CCR7⁺-DC. Die Werte wurden in zwei Experimenten mit 2-3 Tieren pro Gruppe, deren Organe vor der Analyse gepoolt worden, ermittelt.

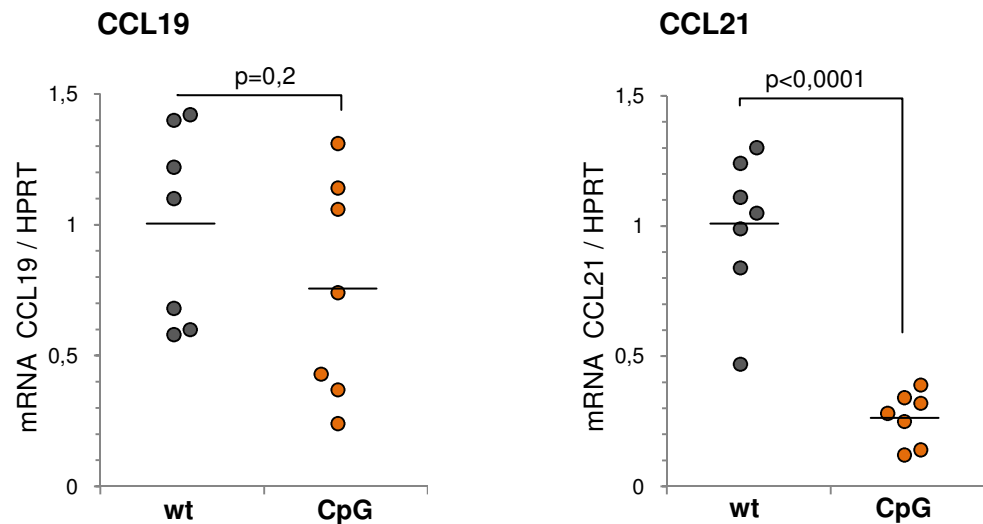


Abb.2.29 Quantitative RT-PCR-Analyse der Expression der Chemokine CCL19 und CCL21. 24 h nach der intranasalen Applikation von 20 nmol CpG wurden behandelten BL6-Mäusen (CpG) und unbehandelten Vergleichstieren (wt) die mediastinalen LK entnommen. Die daraus isolierte mRNA wurde nach reverser Transkription in einer in Echtzeit durchgeführten Polymerase-Kettenreaktion quantifiziert. Zur Normierung wurde der Quotient aus den mRNA-Werten des jeweiligen Parameters und dem mRNA-Wert des Housekeeping-Gens Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT) gebildet. Die dargestellten Werte repräsentieren einzelne Tiere aus zwei unabhängigen Experimenten mit 3-4 Mäusen pro Gruppe.

Die Ergebnisse der Analyse der Expression des Chemokinrezeptors CCR7 und seiner Liganden CCL19 und CCL21 lassen nicht darauf schließen, dass die Herunterregulation dieser Moleküle der Mechanismus für die durch CpG induzierte Inhibition der Migration der DC aus der Lunge in die mediastinalen LK ist. Der Anstieg der absoluten Anzahl CCR7⁺-DC in den mediastinalen LK spricht gegen diese Hypothese. Wie aus der verminderten Expression der Liganden ersichtlich ist, scheinen die Liganden allerdings in die Inhibition der Migration involviert zu sein. Es ist anzunehmen, dass die Chemokine CCL19 und CCL21 durch eine reduzierte Signalwirkung einen verringerten Effekt auf die Migration haben.

3. Diskussion

3.1 CpG reduziert pulmonale allergische Entzündungsreaktionen in Mausmodellen

Bakterieller DNA nachempfundene synthetische CpG-ODN können zur Behandlung pulmonaler allergischer Erkrankungen eingesetzt werden und führen, wie bereits in Tiermodellen unter Verwendung verschiedener Antigene gezeigt [11,23,41,47], zur Inhibition der allergischen Entzündungsreaktion. In der hier vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung von CpG-ODN 1668 (CpG) und OVA als Antigen sowohl an einem klassischen Asthmodell als auch einem Th2-Asthma-Modell die inhibitorische Wirkung von CpG bestätigt. Die Behandlung mit CpG führte dabei zur starken Reduktion des Influx inflammatorischer Zellen in die Lungen, die sich insbesondere in der Verringerung der Eosinophilie ausdrückte.

In den hier durchgeführten Experimenten wurden die Read out-Parameter für die Asthmodelle auf die Untersuchung der zellulären Bestandteile der BAL und die Histologie des Lungenparenchyms beschränkt. Denn es ging vorrangig darum, die Wirkung des verwendeten CpG innerhalb der angewandten Asthmodelle zu zeigen, und die Eosinophilie hatte sich in den bisher publizierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen als eindeutiger und aussagekräftiger Parameter erwiesen [11,49,64,95,102]. Dies war ebenfalls in unserem klassischen Asthmodell der Fall. Im Th2-Modell konnte mit den erhaltenen Resultaten zwar auch die inhibitorische Wirkung von CpG gezeigt werden, die Unterschiede in der Zahl der Eosinophilen zwischen der CpG-behandelten Gruppe und der positiven Kontrollgruppe fielen jedoch nicht so gravierend aus. Dies war besonders im Th2-Modell in BL6-Mäusen ersichtlich, wo die Eosinophilie nur um 50% gegenüber mehr als 90% im klassischen Modell reduziert werden konnte. Möglicherweise lässt sich mit aus OT-II generierten Th2-Zellen kein so gutes Asthmodell etablieren, zumal BL6-Mäuse auch weniger sensitiv für die Induktion allergischer Reaktionen sind. In der Literatur wurden bisher auch nur Th2-Modelle mit BALB/c-Mäusen beschrieben [3,18,19]. Mit der Reduktion der Eosinophile um über 80% wurde hier in dem in BALB/c-Mäusen untersuchten Th2-Asthmodell im Vergleich zu dem Th2-Modell in BL6-Mäusen ein deutlicheres Resultat erzielt. Allerdings wurden hier mehr neutrophile als eosinophile Granulozyten gefunden, was darauf hindeutet, dass die allergische Entzündungsreaktion noch in der Entstehungsphase und nicht vollständig ausgebildet ist. Da die Anzahl der Neutrophilen durch die CpG-

Behandlung in starkem Maße reduziert wurde, trug dieses Ergebnis gleichfalls zur Demonstration der inhibitorischen Wirkung von CpG bei, womit der Zweck der Untersuchung ebenso erfüllt war. Es wäre möglich, die allergische Entzündungsreaktion durch die Erhöhung der Anzahl der Provokationen zu verstärken. Von Cohn und Bottomly wurde gezeigt, dass 7-10 Inhalationen mit Antigen notwendig sind [19], während wir nur drei Inhalationen durchgeführt haben. Eine weitere Ursache für die unzureichende Ausbildung der pulmonalen allergischen Entzündung könnte bei den generierten Th2-Zellen liegen. Trotz des Nachweises des OVA-spezifischen DO11.10-TCR und der Expression von IL-4 lässt sich noch keine Aussage über die Funktionalität der generierten Th2-Zellen machen. Diese zeigt sich erst in der Analyse der allergischen Inflammation der mit den Zellen transferierten Mäuse. Die Ausprägung der Eosinophilie könnte somit auch durch den Grad der Ausdifferenziertheit der kultivierten Th2-Zellen bedingt sein. In allen während dieser Arbeit im Th2-Modell durchgeführten Experimenten wurde eine starke Variabilität in der Ausprägung der allergischen Inflammation beobachtet, die darauf schließen ließ, dass die Qualität der generierten Th2-Zellen großen Schwankungen unterlag. Unterstützt wurde diese Annahme durch die Feststellung, dass in einigen Experimenten 4×10^6 Th2-Zellen eine ähnlich starke Eosinophilie induzierten wie 2×10^6 Th2-Zellen, während in einem anderen Versuch die Inflammation unabhängig von der transferierten Th2-Menge nur ungenügend ausgebildet wurde. Durch die Verbesserung des Protokolls für die Generierung der Th2-Zellen, das sowohl mit der Präparation der DC als auch der Isolierung der OVA-spezifischen T-Zellen einschließlich der für die Zellkultivierung verwendeten Stimulanzen zahlreiche Variablen aufweist, könnte das Th2-Modell vielleicht weiter optimiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Th2-Modell in Hinblick auf die Ausbildung einer pulmonalen Inflammation noch nicht optimal entwickelt ist. Im Rahmen der hier zu untersuchenden Hypothese lag das Interesse jedoch in der Entstehungsphase der allergischen Entzündungsreaktion, weshalb auch die den Asthmodellen folgenden Experimente zur Untersuchung der DC auf die ersten 24 Stunden nach der Induktion der allergischen Reaktion ausgelegt waren. Dafür war es wichtig zu zeigen, dass die CpG-Behandlung die Entwicklung der allergischen Entzündungsreaktion inhibiert, was mit den Ergebnissen aus den Asthmodellen ausreichend bestätigt wurde. Eine weitere Optimierung des Th2-Modells war daher für die Zielstellung dieser Arbeit nicht notwendig.

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung war auch der Grund dafür, dass in den hier untersuchten Asthmodellen die CpG-Applikation einen Tag vor der ersten Antigenprovokation durchgeführt wurde. Während der Provokation wird das Antigen von den DC aufgenommen und über die MHC-Moleküle präsentiert, was zur Aktivierung der antigenspezifischen T-Zellen führt. Unserer Hypothese zufolge sollten die Lungen-DC zu

diesem Zeitpunkt durch den Einfluss von CpG zuvor maturiert worden und somit nicht mehr zur Präsentation des inhalierten Antigens fähig sein. Um speziell diese Effektorphase bei der Entwicklung der asthmatischen Entzündungsreaktion analysieren zu können, war die Untersuchung des Einflusses von CpG in einem akuten Modell ausreichend. Von anderen ist die inhibitorische Wirkung von CpG in akuten [11,64,95] ebenso wie in chronischen [17,102,131] Asthmodellen gezeigt worden. Dabei wurde CpG sowohl vor und während der Sensibilisierungsphase [64,67] als auch vor der Antigenprovokation [11,17,39,95] verabreicht. In allen Modellen war der Einfluss von CpG in der uns interessierenden Effektorphase gegeben, so dass der von uns vorgeschlagene Mechanismus generell eine Erklärung für die inhibitorische Wirkung von CpG bei der Entstehung asthmatischer Erkrankungen sein könnte. In der Hinsicht war auch besonders das Th2-Modell geeignet, weil hier die Aktivierung der antigenspezifischen T-Zellen direkt analysiert werden konnte.

Für weiterführende Untersuchungen wäre sicher die Analyse des Einflusses von CpG auf die Antigenpräsentation in chronischen Asthmodellen interessant, da DC bei jedem erneuten Antigenkontakt, der eine akute inflammatorische Phase auslöst, notwendig sind, um die antigenspezifischen Th2-Zellen zu stimulieren. In einem Langzeitmodell ist der anhaltende Effekt von CpG für sechs Wochen nachgewiesen worden [102]. Eine andere Arbeitsgruppe schlussfolgerte, dass für eine länger andauernde Wirkung die CpG-Behandlung monatlich angewendet werden muss [10]. In weiteren Langzeitversuchen wurde dann in diesem Labor CpG alle zwei Wochen appliziert [17,131]. Diese Ergebnisse passen zu der Vorstellung, dass CpG direkt auf die DC wirkt, da im Verlauf einer chronischen Inflammation DC immer wieder Antigen aufnehmen und der Einfluss von CpG zur Verhinderung der Präsentation des Antigens permanent gegeben sein muss.

Als Parameter zur Bestimmung allergischer Atemwegserkrankungen könnte auch der IgE-Spiegel im Serum dienen. Hier wurde im klassischen Asthmodell das Serum-IgE einmal untersucht und keine Unterschiede zwischen der Gruppe der CpG-behandelten und nicht behandelten BL6-Mäuse gefunden. Dieses Ergebnis ist mit der Instillation von CpG vor der Antigenprovokation zu erklären, denn damit erfolgte der therapeutische Eingriff nach der Sensibilisierungsphase, in der das IgE bereits gebildet wurde. Auch bei Shirota et al. war in einem ähnlichen Asthmodell mit BALB/c-Mäusen kein Effekt auf die systemische IgE-Antwort zu erkennen [95]. Dagegen zeigten andere, dass durch die CpG-Gabe vor oder zusammen mit der Sensibilisierung die IgE-Produktion reduziert werden konnte [64,67]. Demzufolge hat CpG nur einen Einfluss auf die IgE-Produktion, wenn es schon während der Sensibilisierung verabreicht wird. In Bezug auf die Situation im Menschen kommt die Applikation von CpG vor der Antigenprovokation den realen Verhältnissen jedoch näher, denn ein Problem der Behandlung asthmatischer Erkrankungen im Menschen ist, dass die

Krankheit erst nach erfolgter Sensibilisierung diagnostiziert und therapiert wird. Für die Untersuchung des Effekts von vor der Antigenprovokation appliziertem CpG spielte der IgE-Spiegel somit keine Rolle und wurde daher nicht weiter analysiert.

Neben der Bestimmung des IgE-Antikörpers werden in Experimenten mit Modellen zu pulmonalen allergischen Erkrankungen häufig die Cytokine in der BAL analysiert. Wir haben ebenfalls die Analyse der Cytokine IL-5, IL-13 und IL-10 in der BAL durchgeführt. Aufgrund methodischer Probleme mit dem Enzym-gekoppelten Immunnachweis (*engl.: enzyme-linked immunoassay*, ELISA) und zu verdünnter BAL-Flüssigkeiten konnten die Cytokine jedoch kaum detektiert werden, so dass die Ergebnisse der Cytokinbestimmung nicht in diese Arbeit einfließen. Dies vor allem, da die Anzahlen der Eosinophilen als aussagekräftigster Parameter bereits zufriedenstellende Daten geliefert hatten. Die Ergebnisse für die Cytokine IL-5 und IL-13 hätten wahrscheinlich die Resultate der zellulären Analyse der BAL bestätigt, indem die Cytokinspiegel in CpG-behandelten Mäusen in gleichem Maße wie die Eosinophilie erniedrigt gewesen wären. IL-10 war als einziges Cytokin deutlich nachweisbar, allerdings nur in der BAL von CpG-behandelten Mäusen, was für eine IL-10-Erhöhung nach CpG-Instillation spricht.

Der Anstieg des Cytokins IL-10 wird zusammen mit Transforming growth factor- β (TGF β) generell mit regulatorischen Effekten verbunden [61,126]. Daher könnte die Erhöhung von IL-10 auf einen regulatorischen Mechanismus hinweisen. Neben der unter 1.1.3 erläuterten Hygienehypothese wurde aufgrund verschiedener Widersprüche die Hypothese der Gegenregulation hervorgebracht. So gibt es beispielsweise auch Th1-vermittelte Allergien, und diese sind parallel zu den Th2-vermittelten allergischen Erkrankungen angestiegen. Es könnte daher sein, dass die Exposition gegenüber Mikroorganismen in der frühen Lebensphase eher eine Antwort vom regulatorischen Typ induziert, die Th1- und Th2-Inflammationen unterdrücken kann, und dass die Abwesenheit ausreichender Expositionen eine Imbalance zwischen regulatorischen und Effektor- (Th1- oder Th2-) zellen prädisponiert. In dieser Hinsicht wäre es sicher interessant, IL-10 sowie auch TGF β im Zusammenhang mit der Applikation von CpG intensiver zu untersuchen, um weitere Hinweise auf regulatorische Mechanismen, die neben anderen Mechanismen in die Entstehung pulmonaler allergischer Entzündungsreaktionen involviert sind, zu finden. Möglicherweise könnten daraus neue experimentelle Ansätze zur Untersuchung von DC in Bezug auf regulatorische Funktionen entwickelt werden.

Die Bestimmung der Cytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sowie IFN γ und IL-12 weiter zu verfolgen, scheint im Rahmen der Untersuchung des Einflusses von CpG nicht unbedingt angebracht. Von den daraus gewonnenen Daten wären wahrscheinlich keine neuen Erkenntnisse für die

Aufklärung des Mechanismus der Entstehung von asthmatischen Erkrankungen zu erwarten. Denn trotz der sich widersprechenden Daten aus zahlreichen Publikationen ist das Umschalten von einer Th1- auf eine Th2-Antwort als Ursache eher auszuschließen.

3.2 Der Einfluss der CpG-Behandlung auf die Anzahl DC in der Lunge und den mediastinalen LK

3.2.1 Optimierung der Isolierung von DC

Um direkte Untersuchungen mit den DC aus der Lunge und den mediastinalen LK durchführen zu können, mussten mit der Optimierung der Isolierung der DC zunächst die notwendigen Bedingungen für diese Experimente geschaffen werden.

Die Methode der Isolierung von DC aus Lungengewebe mittels Dichtegradienten konnte soweit etabliert werden, dass die optimale Dichte des Nycodenz gefunden wurde, um den größtmöglichen Anteil der Lungen-DC zu erfassen. Allerdings ließ sich das Problem der mitaufgereinigten Makrophagen nicht lösen. Die Ursache darin lag vor allem an den nicht vorhandenen Antikörpern, die für die Depletion der Makrophagen erforderlich gewesen wären. Hierfür müssten sehr spezifische Antikörper gefunden werden, die an Moleküle binden, die nur auf der Zelloberfläche von Makrophagen nachzuweisen sind. Ob mit den entsprechenden Antikörpern die vollständige Depletion der Makrophagen erreicht werden könnte, ist dabei nicht absehbar. Immerhin konnten mit dem Schritt des Nycodenzgradienten die Lungen-DC auf 40% der Zellsuspension angereichert werden. In dieser Reinheit können die DC z.T. schon für einfache Experimente verwendet werden. Beispielsweise ist hiermit die Bestimmung von exprimierten Oberflächenmolekülen, wie CD80, CD86 oder CCR7, mittels FACS-Analyse möglich, da für die Analyse ebenfalls die Zelltyp-spezifischen Moleküle der DC markiert werden. Bei der Auswertung der FACS-Daten können die DC dann anhand ihrer spezifischen Marker eindeutig definiert werden.

Zur Durchführung von funktionalen Assays, wie z.B. Proliferationsassays, müssen die DC jedoch in einer hohen Reinheit vorliegen. Das Ziel, die Lungen-DC über 90%ig rein zu erhalten, war ohne Zellsortierung nicht zu erreichen. Mit den hier ermittelten Resultaten konnte gezeigt werden, dass mit der angewendeten Gatesetzung die nach dem Nycodenzgradienten noch in der Zellsuspension vorliegenden autofluoreszenten Zellen ausgegrenzt werden können. Wirklich optimal wäre es, die Fluoreszenzkanäle FL1 und FL2, in denen die Autofluoreszenz erscheint, nicht zu belegen. Diese Option war schwer realisierbar, da erstens die am häufigsten verwendeten Antikörper-Label in diesen beiden

Kanälen detektiert werden und zweitens der zur FACS-Analyse verwendete FACS Calibur (Becton, Dickinson) nur über 4 Kanäle verfügt. Um das Problem der Autofluoreszenz zu beseitigen, müssten daher Antikörper mit anderen Labeln verwendet werden, die zum Teil jedoch nicht verfügbar sind, oder es müsste auf ungelabelte primäre Antikörper in Kombination mit sekundären Antikörpern zurückgegriffen werden. Zusätzlich wäre ein FACS-Gerät mit erweiterter Kapazität erforderlich. In zwei in letzter Zeit erschienenen hochrangigen Publikationen, in denen Lungen-DC untersucht wurden, ist auch noch keine eindeutige Lösung der Autofluoreszenz-Problematik dargestellt worden [29,78]. McGill et.al haben die autofluoreszenten Zellen gar nicht ausgegrenzt. Sie geben allerdings auch nicht an, wie die verwendeten Antikörper gelabelt waren, so dass nicht nachvollzogen werden kann, in welchen Fluoreszenzkanälen die jeweiligen Marker detektiert worden [78]. GeurtsvanKessel et.al benutzten als Durchflusszytometer den FACS Aria (ebenfalls BD), in dem eine durchflusszytometrische Analyse mit 8 Farben möglich war. Sie sprechen von niedrig und hoch autofluoreszenten Zellen, verwendeten aber Antikörper, deren Label in den Kanälen FL1 und FL2 detektiert werden [29]. Nach der erstmals in der Literatur beschriebenen durchflusszytometrischen Methode zur Diskriminierung von DC und Makrophagen sollte die Verwendung des FL1-Kanals ausreichen, um autofluoreszente Zellen auszugaten [114].

In den beiden erwähnten Publikationen wurden die pulmonalen DC differenziert nach ihren Subpopulationen, CD11b⁺ und CD11b⁻ DC, analysiert. Es wäre auch zu erwarten, dass die Subpopulationen der Lungen-DC bei der Entstehung von Asthma eine unterschiedliche Rolle spielen und ebenso dass CpG die einzelnen Subtypen der DC unterschiedlich beeinflusst. Daher wird es in weiterführenden Untersuchungen unerlässlich sein, die pulmonalen DC sowohl bei der FACS-Analyse als auch während der Zellsortierung zu Anreicherungs Zwecken in ihre Subpopulationen zu unterteilen. Hierzu bietet das neue Durchflusszytometer LSR II von BD, das für die in dieser Arbeit durchgeführten Optimierungen und Experimente noch nicht zur Verfügung stand, vielversprechende Möglichkeiten. Es können bis zu 20 verschiedene Label gleichzeitig detektiert werden, wobei diese technisch gut kompensierbar sind. Im Rahmen neuer Optimierungen der FACS-Analyse der pulmonalen DC am LSR II könnte damit auch das Problem der Autofluoreszenz endgültig gelöst werden.

Die DC aus den mediastinalen LK wurden hier am effizientesten durch die Dissoziation der LK mit anschließender fluoreszenzaktivierter Zellsortierung isoliert. Mit der gewünschten Methode der negativen Depletion war das Ziel, reine DC zu gewinnen, nicht ohne den Einsatz hochkonzentrierter Antikörper und zu großer Verluste an DC erreichbar. Die Anreicherung der LK-DC durch die Depletion vor allem der T- und B-Zellen wäre eine sehr saubere, wenig aufwendige Methode gewesen, bei der die DC in höchstem Maße geschont

würden. Jedoch wird bei den Zellsuspensionen aus dissoziierten LK immer das Problem bestehen, dass die DC nur einen sehr geringen Anteil ausmachen und die Masse aller anderen Zellen depletiert werden müsste, weshalb weitere Optimierungsversuche zur Etablierung der Negativdepletion nicht aussichtsreich scheinen. Obwohl die Anwendung der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung zur über 80%igen Anreicherung vitaler DC führte, ist auch hier der geringe Anteil der DC an der gesamten Zellpopulation von Nachteil. Denn die große Anzahl auszusortierender Zellen verursacht zu lange Sortierzeiten, wodurch ein Teil der DC eventuell an Funktionalität verliert. Hinzu kommt noch, dass insbesondere durch die Präparation der mediastinalen LK viele Erythrozyten in die Zellsuspension gelangen. Eventuell würde hier die Lyse der Erythrozyten weiterhelfen, diese könnte allerdings wieder die Vitalität der DC beeinträchtigen.

3.2.2 Der Einfluss von CpG auf die Anzahl pulmonaler DC

Die Ermittlung der Anzahlen der DC in der Lunge und den mediastinalen LK sowohl im Rahmen der Optimierung der Isolierung der DC als auch in den durchgeführten Experimenten ergab, dass die CpG-Behandlung zu signifikanten Veränderungen in der Menge pulmonaler DC führte.

In naiven Mäusen stieg einen Tag nach der intranasalen CpG-Applikation die absolute Zahl der DC in den Lungen auf das Doppelte an, obwohl ihr prozentualer Anteil um ein Fünftel erniedrigt wurde. In den mediastinalen LK fand sich die dreifache absolute Zahl DC wieder, der prozentuale Anteil der DC verdoppelte sich hier. Die dreifache absolute Zahl DC wurde in den mediastinalen LK auch zwei Tage nach der CpG-Applikation ermittelt, wenn die Tiere einen Tag zuvor OVA-Antigen instilliert bekommen hatte. Durch die OVA-Instillation selbst, ohne zusätzliche vorherige CpG-Behandlung, war die DC-Zahl nur halb so stark angestiegen.

Die signifikanten Anstiege der absoluten Anzahlen der DC in der Lunge und den drainierenden LK weisen eindeutig darauf hin, dass die CpG-Behandlung einen direkten Einfluss auf die DC hat. Die Anwendung von CpG zeigt jedoch eine inhibitorische Wirkung bei der Entstehung von asthmatischen Reaktionen. Daher unterstützen erhöhte Zellzahlen die Annahme, dass der Mechanismus der inhibitorischen Wirkung in einer funktionellen Veränderung der DC zu finden ist, was mit der vorgeschlagenen Hypothese von der Verminderung der Antigenpräsentation übereinstimmen würde. Die Erhöhung der DC ist als Reaktion des Organismus auf die simulierte bakterielle Infektion zu erklären, um mit Hilfe der DC eine adaptive Immunantwort zu initiieren. Dazu passt die Beobachtung, dass auch die Gesamtzahl der Zellen in den mediastinalen LK angestiegen war und somit auch andere

Immunzellen involviert sind. Die Zunahme der DC in den mediastinalen LK ist vergleichbar mit Daten aus der Literatur, in denen gezeigt worden ist, dass es innerhalb eines Tages nach intranasaler Applikation verschiedener bakterieller und viraler Stimuli zu einem Influx von DC in die LK kommt [77].

Durch die schnelle Abwanderung der pulmonalen DC nach CpG-Gabe ließe sich eine Verringerung der DC in der Lunge vermuten. Dafür würde der reduzierte prozentuale Anteil der DC in der Lunge sprechen. Allerdings wurden in der Lunge auch erhöhte Absolutwerte gefunden. Es wäre möglich, dass die abgewanderten DC durch eine schnelle Aktivierung von Gewebs-DC oder durch die Rekrutierung von Vorläuferzellen aus dem Blut ersetzt werden. In der FACS-Analyse von aus Lungen von CpG-behandelten Mäusen isolierten Zellen lassen sich im Vergleich zu Zellen von unbehandelten Tieren noch undefinierte neue Subpopulationen erkennen (zu sehen z.B. in Abb.2.13C). Eine detailliertere Analyse dieser Zellpopulationen könnte zur Erweiterung der Kenntnisse über den Effekt von CpG beitragen.

Der durch die intranasale CpG-Applikation induzierte Anstieg der DC in den mediastinalen LK war auch 48 h nach der Applikation noch zu beobachten. Ob die einen Tag nach der CpG-Behandlung durchgeführte Provokation mit OVA-Antigen einen zusätzlichen Influx von Zellen auslöste, ist an dem Ergebnis nicht nachzuvollziehen, obwohl es nach OVA-Instillation allein auch zu einer Erhöhung der DC in den mediastinalen LK kam. Prinzipiell ist der Effekt von CpG auf die DC stärker einzuschätzen, denn CpG wird als PAMP über einen TLR erkannt und löst damit eine Immunreaktion aus, die zu einer schnellen Maturierung und Mobilisierung der DC mit anschließender Induktion von Effektorzellen führt. OVA dagegen induziert als Antigen eine tolerogene Antwort, für die aber ebenfalls ein aktiver Prozess mit Antigenpräsentation und T-Zellproliferation, bei dem die T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen differenzieren, notwendig ist [20]. Damit wäre dann auch die in OVA-instillierten Mäusen gegenüber PBS-instillierten Tieren erhöhte Anzahl von DC in den mediastinalen LK zu erklären, obwohl OVA ohne Adjuvant kein immunogenes Antigen ist.

Im Rahmen der Untersuchung der Antigenpräsentation von DC aus der Lunge sensibilisierter Mäuse wurden auch die Zahlen der Lungen-DC analysiert, wobei sich ein unerwarteter Effekt von CpG zeigte. In sensibilisierten Tieren führte die Antigenprovokation mit OVA, im Vergleich zu nicht sensibilisierten und provozierten Tieren, innerhalb von zwei Stunden zu einer drastischen Zunahme der Lungen-DC. Durch die Vorbehandlung mit CpG wurde die antigeninduzierte Zunahme der Lungen-DC sowohl prozentual als auch absolut um die Hälfte reduziert.

In mit OVA und Alum sensibilisierten Tieren liegt bereits ein Milieu vor, durch das eine Provokation der Tiere mit OVA zur Ausbildung einer allergischen pulmonalen Inflammation führt. Der starke Anstieg der Lungen-DC zwei Stunden nach der OVA-Instillation beweist, dass die DC in die Entstehung der allergischen Entzündung involviert sind. Denn nach dem für die zelluläre Immunologie modifizierten Postulat 1 von Koch ist ein Zelltyp in eine Krankheit involviert, wenn er im Vergleich zu gesunden Organismen in erhöhter Anzahl gefunden wird [71]. Dementsprechend ist auch von anderen Arbeitsgruppen in Asthmodellen bei Mäusen und Ratten gezeigt worden, dass die allergische Atemwegsentzündung von vielfachen Erhöhungen der mDC in der Lunge, inklusive der erhöhten Produktion von Vorläuferzellen, begleitet wird [73,111,113]. Nach der Antigenprovokation wird das OVA von den DC in der Lunge aufgenommen, woraufhin die DC dieses prozessieren, dabei maturieren und zu den drainierenden LK migrieren. In einer bereits laufenden asthmatischen Erkrankung könnte jedoch auch ein Teil der DC im Lungenparenchym verbleiben und dort die antigenspezifischen Th2-Zellen, die nach der Aktivierung in den mediastinalen LK in die Lunge zurückgewandert sind, stimulieren. So wurden in einem murinen Asthmodell mit dem LACK-Antigen von *Leishmania* schon einen Tag nach der Antigenprovokation LACK-Peptid präsentierende DC in der Lunge nachgewiesen, deren Zahl am zweiten Tag weiter anstieg und bis zu einer Woche anhielt [55]. Weiterhin wurden Lungen-DC von sensibilisierten und OVA-provozierten Mäusen mit einem reifen Phänotyp beschrieben [113]. Ebenfalls ist die Interaktion von DC mit T-Zellen in der Lunge visuell dargestellt worden [14,45].

Interessanterweise war hier in sensibilisierten Mäusen gefunden worden, dass CpG die starke Zunahme der DC in der Lunge nach OVA-Provokation inhibiert. Dieser Effekt könnte ebenso ein Teil des Mechanismus sein, mit dem CpG die allergische Atemwegsentzündung verhindert. Wie dieser Mechanismus im Detail funktioniert, ist bisher nicht bekannt und bedarf weitergehender Versuche. Eventuell führt die intranasale Behandlung mit CpG in sensibilisierten Tieren zu einer verstärkten Apoptose der DC in der Lunge. Im Menschen ist gezeigt worden, dass inhalierte Steroide, die bisher vorrangig zur Behandlung der Symptome von Asthma eingesetzt werden, die Anzahl und Funktionalität von Lungen-DC reduzieren [81]. In der trachealen Mukosa von Ratten wurden dann gezeigt, dass Corticosteroide diese Reduktion durch die Induktion von Apoptose herbeiführen [12].

Für diese Arbeit wurde die Anzahl der DC in der Lunge nach Antigenprovokation nur in klassisch sensibilisierten Mäusen bestimmt. Es wäre interessant, die Lungen-DC ebenso im Th2-Asthmodell zu untersuchen. Hier wurde im Rahmen von vorbereitenden Experimenten festgestellt, dass die transferierten Th2-Zellen nach OVA-Instillation in großer Anzahl ins Lungengewebe und die zuführenden Atemwege rekrutiert worden, was in den

Tieren der CpG-vorbehandelten Gruppe nur in reduziertem Maße erfolgte (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung könnte darauf zurückschließen lassen, dass, so wie in klassisch sensibilisierten Mäusen gezeigt, weniger antigenpräsentierende Zellen in der Lunge von CpG-behandelten Tieren vorhanden sind. Um die Wirkung von CpG auf die DC in der Lunge bei der Entstehung von allergischen Entzündungsreaktionen weiter aufzuklären, könnte eine genauere Analyse der pulmonalen DC im Th2-Modell ebenso wie vertiefende Experimente mit Lungen-DC aus sensibilisierten Mäusen beitragen. Hierbei könnten sowohl die Charakterisierung des Phänotyps und der Subpopulationen als auch kinetische Untersuchungen neue Hinweise liefern.

3.3 CpG aktiviert die pulmonalen DC, inhibiert aber nicht die Antigenpräsentation

Zur Bestätigung der Hypothese, dass CpG durch Aktivierung der DC in der Lunge die Antigenpräsentation nachfolgend aufgenommener Antigene inhibiert, wurde zunächst die Maturierung der pulmonalen DC nach intranasaler Applikation von CpG *in vivo* demonstriert. Die Aktivierungsmarker CD80 und CD86 sowie die MHC-II-Moleküle waren auf den DC der Lunge und den mediastinalen LK hochreguliert. Dieses Ergebnis entspricht der durch die CpG-Behandlung erwarteten Aktivierung, wie sie bereits für die residenten DC in der Milz gezeigt worden ist [132]. Mit dem synthetischen Agonisten MALP-2 wurde ein vergleichbarer Maturierungsgrad der DC erreicht. Dies ist damit zu erklären, dass MALP-2 die DC zwar über TLR2 und 6 anstatt wie CpG über TLR9 aktiviert, beide Signalwege jedoch über MyD88 weitergeleitet werden und in der Aktivierung von NF κ B münden [109].

Kontrovers zu unseren Daten haben Hessel et al. eine verminderte Expression von CD80, CD86 und MHC-II auf Lungen-DC aus CpG-vorbehandelten Mäusen gefunden [39]. Allerdings wurden in dieser Studie die DC von sensibilisierten und provozierten Tieren analysiert. Im Rahmen einer allergischen pulmonalen Entzündung weisen die Lungen-DC schon erhöhte Aktivierungsmarker auf [113]. Dementsprechend kann die Hochregulation der Aktivierungsmarker durch CpG nicht weiter stimuliert werden. Bei genauer Betrachtung der dargestellten Histogramme aus den Daten von Hessel et al. ist die analysierte erniedrigte Expression der Moleküle CD80, CD86 und MHC-II auch nicht wirklich eindeutig zu erkennen [39]. Es ist eher wahrscheinlich, dass kein Unterschied zwischen den Lungen-DC aus unbehandelten oder behandelten sensibilisierten Mäusen besteht oder dass die DC aus Tieren mit einer pulmonalen allergischen Inflammation noch stärker maturiert sind, als es CpG induzieren kann. In dieser Hinsicht wäre es auch in unseren Modellen interessant, den

Maturierungsstatus der DC in sensibilisierten Tieren vor und nach CpG-Applikation zu analysieren. Eine weitere Ursache für die Diskrepanz der von Hessel gefundenen Daten zu unseren Daten könnte in der Aufreinigung der DC aus der Lunge liegen. Während wir eine schonende Methode zur Isolierung der DC einsetzten, bei der die Aktivierung der Zellen ausgeschlossen wird, haben Hessel et al. die Zellen bei der Aufreinigung für eine Stunde in einer Petrischale inkubiert. Das könnte aufgrund des Kontaktes der Zellen zu einer Oberfläche zur Aktivierung der DC in allen Proben führen.

In den beiden dem Nachweis des Maturierungseffekts von CpG auf die pulmonalen DC folgenden Experimenten konnte die Hypothese, dass CpG durch Aktivierung der DC in der Lunge die Antigenpräsentation nachfolgend aufgenommener Antigene inhibiert, bestätigt werden. So war die Präsentation von 24 h nach CpG-Behandlung intranasal appliziertem OVA in den mediastinalen LK inhibiert. Das wurde einerseits *in vivo* anhand der reduzierten Proliferation von adoptiv transferierten OT-II- und OT-I-Zellen gezeigt. Andererseits präsentierten die einen Tag nach OVA-Instillation aus den mediastinalen LK von CpG-behandelten Tieren isolierten DC dieses Antigen auch *in vitro* nur in stark reduziertem Maße an OT-II und OT-I. Das Resultat eines späteren Experiments, in dem mit intranasal transferierten BM-DC die Antigenpräsentation von OVA in den mediastinalen LK wieder hergestellt werden konnte, trug ebenfalls zur Annahme der Richtigkeit der Hypothese bei. Mit der *in vitro*-Analyse der 24 h nach CpG-Gabe aus der Lunge und den mediastinalen LK isolierten DC wurde die Hypothese dann jedoch widerlegt. Die DC aus CpG-behandelten Mäusen wiesen gegenüber DC aus wt-Mäusen keine verminderte Kapazität zur Antigenpräsentation auf. Das MHC-Klasse-II-restriktive OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid wurde, korrelierend zur erhöhten Expression der MHC-II-Moleküle, sogar um ein Vielfaches besser präsentiert. Ein adäquates Ergebnis zeigte sich bei der Analyse der Antigenpräsentation von Lungen-DC aus sensibilisierten Tieren.

Die Proliferation von adoptiv transferierten OT-II-Zellen in den mediastinalen LK war neben unbehandelten und CpG-behandelten Mäusen auch in Tieren analysiert worden, die 24 h vor der OVA-Instillation mit MALP-2 behandelt worden waren. Der TLR-Ligand MALP-2 wurde zum Vergleich eingesetzt, weil ebenfalls in einem klassischen OVA-Asthmamodell gezeigt worden war, dass durch Gabe von MALP-2 24 h vor Antigenprovokation die allergische Entzündungsreaktion und die Hyperreaktivität der Atemwege reduziert wurden. Allerdings hatte MALP-2 diesen inhibitorischen Effekt nur, wenn es in Kombination mit IFN γ appliziert wurde [121]. Dieses Ergebnis deutet bereits darauf hin, dass der inhibitorische Effekt von MALP-2 möglicherweise einem anderen Mechanismus unterliegt als die inhibitorische Wirkung von CpG. Schließlich wurde auch herausgefunden, dass MALP-2, obwohl es die DC

in vergleichbarem Ausmaß wie CpG maturiert, nicht die Antigenpräsentation nachfolgend verabreichter Antigene sowohl auf MHC-Klasse-I als auch MHC-Klasse-II inhibiert. Wohingegen CpG in den gleichen experimentellen Ansätzen die Cross-Präsentation und die klassische MHC-II-Präsentation reduzierte [Prajeeth CK, nicht veröffentlichte Daten]. Diese Daten korrelieren auch mit dem hier dargestellten Ergebnis, dass die Reduktion der Proliferation von adoptiv transferierten OT-II in den mediastinalen LK von CpG-behandelten Mäusen, jedoch nicht in denen von MALP-2-behandelten Tieren, gefunden wurde.

Für die *in vitro*-Analyse wurden die DC 24 h nach der CpG-Applikation aus der Lunge und den mediastinalen LK isoliert, um die Zellen zu einem Zeitpunkt zu untersuchen, der der Antigenprovokation entspricht. Für die DC in der Lunge ist dieser Zeitpunkt relevant in Hinblick auf die Induktion der allergischen Inflammation, da die Lungen-DC dann das Antigen aufnehmen, maturieren und zu den drainierenden LK migrieren, wo sie die antigenspezifischen T-Zellen stimulieren. Die zu diesem Zeitpunkt aus den mediastinalen LK isolierten DC lassen keine Aussage über die Antigenpräsentation des instillierten Antigens zu, sie repräsentieren aber die durch CpG maturierten Lungen-DC, die direkt nach der intranasalen Applikation von CpG in die LK eingewandert sind.

Die aus sensibilisierten Mäusen isolierten Lungen-DC wiesen nach der Exposition mit OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid und OVA-Protein *in vitro* eine ähnliche Kapazität zur Stimulation von T-Zellen auf wie die aus den Lungen von naiven Mäusen isolierten DC. Sie unterschieden sich gegenüber den DC aus naiven Mäusen jedoch in ihrer starken Präsentation von *in situ* in der Lunge aufgenommenem OVA. Die Präsentation dieses endogenen OVA war sowohl in DC aus den Lungen von unbehandelten sensibilisierten als auch CpG-behandelten sensibilisierten Tieren ausgeprägt. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in dem in der Lunge vorherrschenden proinflammatorischem Milieu, durch das die Maturierung der DC nach Aufnahme des OVA extrem begünstigt wird. In diesem Kontext scheint intranasal gegebenes CpG keinen weiteren Einfluss auf den Maturierungsgrad der DC zu haben und kann somit die Präsentation von endogenem OVA weder steigern noch verhindern.

Die Entwicklung der Hypothese, dass CpG durch Aktivierung der DC in der Lunge die Antigenpräsentation nachfolgend aufgenommener Antigene inhibiert, liegt in Arbeiten begründet, die die Herunterregulation der Cross-Präsentation und der MHC-II-Präsentation während des Prozesses der DC-Maturierung gezeigt haben [128,132]. Allerdings wurde dort die Herunterregulation an DC aus der Milz demonstriert, wogegen es sich bei den Lungen-DC um Zellen aus peripherem Gewebe handelt. Der hier ermittelte Maturierungseffekt von CpG auf die pulmonalen DC ließ ähnliche Ergebnisse zu den DC aus der Milz erwarten. Doch die Untersuchung der Antigenpräsentation deckte auf, dass die Kapazität der

Antigenpräsentation in den pulmonalen DC durch CpG nicht verringert wird. Dieses Resultat deutet auf Unterschiede in DC aus der Peripherie zu residenten DC in sekundären lymphatischen Organen hin. Dafür spricht auch die schwache Fähigkeit der pulmonalen DC aus wt-Tieren, T-Zellen zu stimulieren, wie es sowohl in unseren Versuchen gesehen (siehe 2.4.4) als auch in der Literatur beschrieben wurde [123].

Ein Grund für die Inhibierung der Präsentation von nach CpG-Behandlung verabreichten Antigenen in den DC aus der Milz war die Herunterregulation der Phagozytose [128], die Antigenaufnahme durch Endozytose sowie die anschließende Degradation des Proteins waren jedoch nicht betroffen [132]. Daher sollte auch lösliches OVA von den durch CpG maturierten pulmonalen DC weiter aufgenommen werden können.

Young et al. zeigten, dass die Inhibition der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II-Ebene der Herunterregulation der Neusynthese von MHC-II-Molekülen während des Maturierungsprozesses zugeschrieben werden kann. Dadurch wird die Bildung von neuen MHC-II-Peptid-Komplexen in reifen DC verhindert [132]. Diese Einschränkung würde sich allerdings auch in den Lungen-DC auf endozytiertes OVA auswirken. Mit unseren Ergebnissen konnte nicht gezeigt werden, dass CpG diesen Prozess in den pulmonalen DC auslöst, dazu wären weitere gezielte Analysen notwendig.

Da das endozytierte OVA über den MHC-Klasse-II-Weg präsentiert wird, spielt die Cross-Präsentation in Hinsicht auf das reine Allergen keine Rolle. Daher war hier die Antigenpräsentation der isolierten pulmonalen DC *in vitro* in erster Linie auf MHC-Klasse-II-Ebene untersucht worden. Es ist aber durchaus möglich, dass OVA im Kontext von pulmonalen allergischen Entzündungsreaktionen auch als zellassoziertes Antigen vorkommt. Daher wäre es interessant, die pulmonalen DC sowohl von naiven als auch sensibilisierten Tieren, die nicht oder mit CpG behandelt wurden, *in vitro* ebenso auf MHC-Klasse-I-Ebene zu untersuchen. Eventuell lässt sich dabei auch in der Lunge die inhibitorische Wirkung von CpG auf die Antigenpräsentation nachfolgend instillierten Antigens nachweisen. Dazu wäre allerdings auch zu klären, in welchem Umfang die Cross-Präsentation bei der Entwicklung der allergischen Entzündungsreaktion beteiligt ist.

In einem von einer anderen Arbeitsgruppe vorgeschlagenen Mechanismus wurde ebenfalls der Ansatz gemacht, die inhibitorische Wirkung von CpG-ODN bei der Entwicklung von allergischen Atemwegsentzündungen in einem Effekt auf antigenpräsentierende Zellen zu sehen [39]. Hessel et al. haben Lungen-DC aus unbehandelten sowie CpG-behandelten sensibilisierten und OVA-provozierten Mäusen isoliert und herausgefunden, dass die DC aus CpG-behandelten Tieren *in vitro* eine reduzierte Cytokinfreisetzung in antigen-spezifischen

Th2-Zellen induzieren [39]. Dieses Ergebnis könnte auch auf eine herunterregulierte Antigenpräsentation zurückgeführt werden und würde daher mit unserer Hypothese übereinstimmen. Allerdings waren die isolierten APC durchaus fähig, Th1-Zellen zu stimulieren, was zumindest darauf hinweist, dass der klassische MHC-II-Weg einschließlich der Bildung neuer MHC-II-Peptid-Komplexe nicht beeinträchtigt scheint.

Die von uns bei der Untersuchung der Antigenpräsentation nach CpG-Applikation gefundene reduzierte Proliferation von adoptiv transferierten OT-II- und OT-I-Zellen *in vivo* als auch die reduzierte Proliferation von OT-II und OT-I nach Stimulation mit aus mediastinalen LK von CpG-behandelten Tieren isolierten DC *in vitro* könnten in der Suppression der T-Zellen durchIDO begründet sein. Es ist gezeigt worden, dass CpG die Expression von IDO in DC und anderen Zellen in der Lunge induziert [35]. Das führte zum vermehrten Zelltod von Th2-Zellen in allergischen Mäusen, was die Reduktion von Lungeninflammation und Atemwegshyperreaktivität zur Folge hatte. Durch die Applikation von 1-Methyl-DL-Tryptophan (M-trp), eines Inhibitors von IDO, konnte die Reduktion der allergischen Entzündungsreaktion wieder aufgehoben werden. In dem experimentellen murinen Asthmodell von Hessel et al. konnte zwar die Expression von IDO in der Lunge aber nicht der Effekt von IDO innerhalb des Inhibitionsmechanismus der Th2-Antwort reproduziert werden [39]. Unsere Daten sprechen gegen den Einfluss von IDO auf die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Resultate. So wurde mit der Restauration der T-Zellproliferation in den mediastinalen LK nach intranasalem Transfer von BM-DC gezeigt, dass der Effekt bei der verhinderten Antigenpräsentation und nicht der Suppression der T-Zellen selbst liegt. Ebenso wurden OT-II durch pulmonale DC, die aus CpG-behandelten Mäusen isoliert worden waren, erheblich stärker zur Proliferation stimuliert als durch DC aus unbehandelten Tieren, womit einer Unterdrückung der T-Zellen durch IDO widersprochen wird.

Im Rahmen der Untersuchung der Antigenpräsentation isolierter pulmonaler DC wurden die DC aus der Lunge als gesamte CD11c⁺-MHC-II⁺-Population analysiert. Von den DC-Subpopulationen, CD11b⁺ CD103^{-/low} und CD11b⁻CD103⁺ DC, ist bisher bekannt, dass beide an der Antigenpräsentation beteiligt sind. Zudem sind bereits individuelle Fähigkeiten nachgewiesen worden [6,53,71]. Eine präzise Analyse der Antigenpräsentation von CD11b⁺ und CD103⁺ DC aus CpG-behandelten und nicht behandelten Tieren würde nur Sinn machen, wenn sich ein inhibierender Effekt von CpG auf die Antigenpräsentation herausgestellt hätte.

Die hier optimierte Methode zur Anreicherung von DC aus der Lunge war vorrangig auf die Isolierung von mDC ausgelegt, da auch der Fokus unserer Untersuchungen auf der Inhibition der Antigenpräsentation dieser Zellen lag. Da sich jedoch herausstellte, dass CpG die

Kapazität der Antigenpräsentation von pulmonalen mDC eher erhöhte als unterdrückte, könnte es auch einen verstärkenden Effekt auf die pDC in der Lunge haben. In diesem Fall würden die Daten wieder auf die Beteiligung von regulatorischen Mechanismen hinweisen, denn pDC sind in die Erzeugung von Toleranz involviert. In einer Studie von de Heer et al. wurde durch Depletion der pDC in der Lunge die Toleranz gegenüber dem inhalieren Antigen beseitigt und durch den adoptiven Transfer von mit FLT3L (*engl.: FMS-related tyrosin kinase 3 ligand*) kultivierten BM-pDC wieder rekonstruiert [21]. Ebenfalls wurde dort gezeigt, dass pDC mit der Funktion von mDC interferieren, indem sie die Generierung von durch mDC induzierte Effektor-T-Zellen supprimieren. Darüber hinaus erhöht die Instillation von CpG die Expression des Glykoproteins PD-1 (*engl.: programmed death 1*) auf pulmonalen pDC [39]. Dieses Molekül agiert als bedeutender negativer Regulator der Th2-Antwort. Mit der Untersuchung des Einflusses von CpG auf die Antigenpräsentation von pDC ebenso wie der Analyse hochregulierter Oberflächenmoleküle und exprimierter Cytokine könnten somit weitere bedeutende Erkenntnisse zur Aufklärung des Mechanismus, mit dem CpG die pulmonale allergische Inflammation inhibiert, gewonnen werden.

3.4 CpG inhibiert die Migration pulmonaler DC

Die Hypothese, dass CpG durch Aktivierung der DC in der Lunge die Antigenpräsentation nachfolgend aufgenommener Antigene inhibiert, wurde mit der *in vitro*-Analyse der aus der Lunge und den mediastinalen LK isolierten DC widerlegt. Allerdings war auch eindeutig gezeigt worden, dass 24 h nach CpG-Gabe inhaliertes oder intranasal verabreichtes OVA nicht in den mediastinalen LK präsentiert wurde. Die Ursache dafür konnte schon in der Lunge bei der Antigenaufnahme oder beim Transport des Antigens in die drainierenden LK liegen. Durch die Rückverfolgung der Wanderung CFSE-gelabelter DC aus der Lunge in die mediastinalen LK stellte sich heraus, dass die Migration der pulmonalen DC nach CpG-Gabe wirklich gehemmt wurde. Auf die Antigenaufnahme selbst konnte kein inhibierender Effekt nachgewiesen werden, wie es anhand der gleichmäßigen Aufnahme fluoreszenzmarkierter Beads durch Lungen-DC zu sehen war. Die erfolgreiche Restauration der Migration und in der Folge der Antigenpräsentation mittels intranasal transferierter BM-DC ließ eher auf eine direkte Wirkung des intranasal applizierten CpG auf die DC als auf eine Veränderung des Chemokinmilieus in der Lunge schließen. Das konnte jedoch nicht dem für die Emigration aus dem Gewebe in die drainierenden LK hochregulierten Chemokinrezeptor CCR7 zugeschrieben werden, da die CpG-Behandlung die Expression dieses Rezeptors nicht unterdrückte. Dagegen waren die mRNA-Level der Chemokinliganden CCL19 und CCL21 erniedrigt, was wiederum für eine Reduktion der Signalwirkung aus den drainierenden

Lymphwegen sprach. Davon wurden zwar die Lungen-DC aber offensichtlich nicht die adoptiv transferierten BM-DC beeinflusst.

Zur Quantifizierung der Migration der DC aus der Lunge in die mediastinalen LK war die CpG-Applikation sowohl parallel zur Instillation von CFSE als auch 24 h zuvor durchgeführt worden. Die 18 h nach CFSE-Instillation ermittelten Ergebnisse stimmten mit Daten aus der Literatur überein, wonach CpG als inflammatorischer Stimulus initial die Migration beschleunigt, was innerhalb der ersten 18-24 h zu einem Anstieg von CFSE⁺ DC in den mediastinalen LK führt. Danach wird eine transiente Phase induziert, in der die respiratorischen DC unempfindlich gegenüber einem weiteren Stimulus sind, was sich darin zeigt, dass keine weiteren CFSE⁺ DC in die LK einwandern [77]. In den ersten Stunden nach Induktion des Migrationsschubs muss der Zeitpunkt liegen, an dem CpG seine inhibitorische Wirkung entfaltet. Es ist denkbar, dass CpG einen Mechanismus der negativen Rückkopplung auslöst. Der nach CpG-Applikation innerhalb von 18-24 h ausgelöste Influx von DC in die mediastinalen LK reicht möglicherweise aus, um eine effiziente Immunantwort auf den potentiellen bakteriellen Erreger zu stimulieren. Um eine Überreaktion zu vermeiden, wird vorübergehend die Migration weiterer antigenpräsentierender Zellen aus der Lunge in die drainierenden LK unterdrückt. Dabei könnte CpG auf verschiedene Zelltypen in der Lunge sowie in den die Lunge drainierenden afferenten Lymphwegen einwirken und die Expressionsmuster von Cytokinen und Chemokinen verändern.

Wenn wir in unseren Experimenten CpG unmittelbar vor CFSE intranasal applizierten, fanden wir 18 h später durchschnittlich 9,2% CFSE⁺ CD11c⁺ Zellen in den mediastinalen LK wieder. Dieses Resultat stimmt mit dem Ergebnis von Legge und Braciale, die 12 h nach CpG-Gabe 10,1% CFSE⁺ DC fanden, überein [77]. Unser Ergebnis, wonach in unbehandelten Mäusen 15% der DC in den mediastinalen LK CFSE⁺ waren, steht jedoch im Widerspruch zu den Daten dieser Arbeitsgruppe. Dort wurde gezeigt, dass ohne einen potenten inflammatorischen Stimulus im respiratorischen Kompartiment eine konstitutive Migration statt findet, infolge derer nur 2% der DC in den mediastinalen LK aktuell eingewanderte DC aus der Lunge repräsentieren. Da eine infektiöse Verunreinigung des in PBS mit DMSO gelösten CFSE unwahrscheinlich ist, könnte der hohe Anteil CFSE⁺ DC in unseren unbehandelten Mäusen auf eine Diffusion des Farbstoffs in die Lymphe hinweisen. Dadurch würde CFSE passiv in die drainierenden LK gelangen. Von Jakubzick et al. ist gezeigt worden, dass infolge der Instillation von CFSE auch CD11c⁻ CD11b⁻ Zellen in den mediastinalen LK CFSE⁺ waren [53]. In unseren Experimenten hätten dann allerdings auch in den als Negativkontrolle dienenden CCR7^{-/-}-Mäusen prozentual mehr CFSE⁺ DC gefunden werden müssen, weil sich auch in den mediastinalen LK dieser Tiere residente DC befinden, die von CFSE angefärbt werden oder den Farbstoff aufnehmen könnten.

Um den Anteil des möglichen passiven Transports des Tracers mit dem Lymphfluss bei der Untersuchung der Migration der respiratorischen DC zu minimieren, wurden im Folgeexperiment fluoreszenzgelabelte Mikrosphere-Beads verwendet. Diese wurden in unbehandelten Mäusen durch die DC im Respirationstrakt aufgenommen und in über die konstitutive Migration hinausgehendem Maße in die mediastinalen LK transportiert. Von anderen Arbeitsgruppen durchgeführten Studien zufolge ist davon auszugehen, dass Makromoleküle gezielt von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen werden und eine Immunantwort induzieren. So ist demonstriert worden, dass die DC auch in der Abwesenheit einer Inflammation kontinuierlich die Luftwege auf vorhandene Antigene hin überprüfen. Dabei wurden fluoreszenzgelabelte Makromoleküle, die nicht die epitheliale Barriere durchdringen, von den respiratorischen DC aufgenommen und innerhalb von 12 h zu den T-Zell-Zonen der drainierenden mediastinalen LK transportiert [34,116]. Diese Situation sollte sich auch im Fall von OVA so darstellen. Aufgrund dessen lässt sich auch unser Ergebnis, dass weniger als ein Zehntel Beads-tragende DC in den mediastinalen LK von CpG-behandelten Mäusen als in den mediastinalen LK von unbehandelten Tieren detektiert wurden, eindeutig dahingehend interpretieren, dass 24 h nach CpG-Applikation die Emigration der DC aus der Lunge inhibiert wurde.

Die 0,05 µm großen Beads wurden unabhängig von der intranasalen Behandlung mit CpG von den Lungen-DC aufgenommen. Das Resultat ist damit zu erklären, dass Beads dieser Größe, ebenso wie OVA, durch Endozytose aufgenommen werden. Wilson et al. haben für ihre Versuche, in denen sie zeigten, dass CpG die Phagozytose nachfolgend verabreichter Antigene inhibiert, 0,5 µm große Beads verwendet [128]. Mit größeren als den hier benutzten Mikrosphere-Beads ließe sich wahrscheinlich auch für die respiratorischen DC nachweisen, dass CpG die Phagozytose nachfolgend verabreichter Antigene reduziert. Für die Aufnahme von OVA hätte das keine weitere Bedeutung, möglicherweise ist aber im Rahmen einer ausgebildeten allergischen Inflammation die Aufnahme von OVA-Antikörper-Komplexen über den Vorgang der Phagozytose erforderlich.

Zur Eruiierung des Mechanismus hinter der Inhibition der Migration der pulmonalen DC durch CpG wurden der Chemokinrezeptor CCR7 sowie seine Liganden CCL21 und CCL19 analysiert. In CCR7^{-/-}-Mäusen war nachgewiesen worden, dass CCR7 essentiell für die Migration peripherer DC in die drainierenden LK ist [24,40]. Dementsprechend wird CCR7 zusammen mit MHC-II und den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 während der Maturierung der DC hochreguliert [129]. Die von uns gefundene erhöhte Expression von CCR7 auf den DC in den mediastinalen LK korreliert mit der Hochregulation von MHC-II, CD80 und CD86 24 h nach Applikation von CpG. Damit wird der Maturierungseffekt von CpG auf die pulmonalen DC bestätigt. Allerdings macht dieses Ergebnis auch deutlich, dass

CCR7 nicht in die Inhibition der Migration der pulmonalen DC involviert ist. Die Bedeutung von CCL21 und CCL19 für die Migration war ebenfalls in KO-Mäusen, denen die Gene für diese Liganden fehlen, nachgewiesen worden. Speziell für pulmonale DC war gezeigt worden, dass Mäuse, denen die Liganden von CCR7 fehlten, eine reduzierte konstitutive Kapazität zum Transport von Latexpartikeln von der Lunge in die mediastinalen LK hatten [52]. Auch wir fanden einen Tag nach der intranasalen CpG-Gabe reduzierte mRNA-Level für CCL21 und CCL19 in den mediastinalen LK, die auf eine Beteiligung der beiden Chemokine an der reduzierten Migration der pulmonalen DC schließen lassen. Von Müller et al. veröffentlichte Daten zeigen den ersten deutlichen Abfall der Expression von CCL21 und CCL19 infolge einer viralen Infektion nach drei Tagen mit einem Minimum bei acht Tagen [82]. In unseren Versuchen wurden die beiden Chemokine an Tag eins nach der CpG-Applikation analysiert, da dieser Zeitpunkt, wie schon oben erläutert, für die Induktion der allergischen Entzündungsreaktion bedeutend ist und die Migration der pulmonalen DC 24 h nach der Applikation von CpG bereits inhibiert war. Die von uns gemessene Reduktion der beiden Chemokinliganden, insbesondere von CCL21, scheint einen Tag nach CpG-Gabe bereits ausreichend zu sein, um die Migration der pulmonalen DC zu beeinträchtigen. Es ist anzunehmen, dass die Chemokinlevel danach auch in unserem experimentellen Ansatz weiter sinken würden.

Welchen konkreten Einfluss CCL21 und CCL19 auf die Migration der DC im Respirationstrakt haben, könnte durch Experimente mit paucity of lymph-node T cells (*plt/plt*)-Mäusen untersucht werden. *Plt/plt*-Mäuse sind ein natürlich vorkommender Stamm von Mäusen mit einer autosomal rezessiven Mutation, in denen der die für CCL19 und CCL21-Ser kodierenden Gene tragende Locus deletiert ist. Dabei wurde das für CCL21-Leu, die zweite der beiden in Mäusen vorkommenden funktionellen CCL21-Varianten, kodierende Gen intakt gelassen [2,24]. CCL21-Ser wird in lymphoiden Organen wie Thymus, LK und Milz exprimiert, CCL21-Leu dagegen in den Lymphgefäßen von nicht lymphatischen Organen wie Lunge, Darm, Magen, Herz und Haut. Die Expression von CCL21-Leu in *plt/plt*-Mäusen erlaubt die Mobilisation der DC in der Peripherie. In Versuchen mit diesen Tieren ist mittels FITC-Markierung der Haut gezeigt worden, dass DC aus der Epidermis herauswandern und sich in den dermalen Lymphgefäßen sammeln. Subkutan injizierte DC aus wt-Tieren migrierten zu den drainierenden LK, allerdings in geringerer Anzahl als in wt-Mäusen [30]. Eine andere Gruppe neutralisierte mit Antikörpern CCL21 und inhibierte damit die Migration von DC aus der Haut in die drainierenden LK [90]. Diese Studien führten zu der Annahme, dass der Defekt der DC-Migration in *plt/plt*-Mäusen an der Stelle des Eintritts von der Lymphe in die LK und nicht vom Gewebe in die afferenten Lymphgefäße liegt. Möglicherweise sammeln sich in *plt/plt*-Mäusen auch die DC aus der Lunge in den afferenten

Lymphgefäßen an und gelangen nur zu einem niedrigen Prozentsatz in die mediastinalen LK. Ist die Herunterregulation von CCL21 die Ursache für die durch CpG inhibierte Migration der Lungen-DC, sollten diese Zellen nach CpG-Applikation in *plt/plt*-Mäusen in der Lunge festgehalten werden und im Vergleich zu unbehandelten *plt/plt*-Mäusen nicht bis in die Lymphgefäße vordringen. Anderenfalls könnte vermutet werden, dass CpG die pulmonalen DC nur am Eintritt in die LK hindert. Besonders aufschlussreich wäre es natürlich, in unseren experimentellen Ansätzen die mRNA-Level der beiden CCL21-Varianten differenziert zu bestimmen.

Die Migration intranasal transferierter BM-DC wurde in CpG-behandelten Mäusen eher noch gefördert als, wie die Migration der pulmonalen DC, inhibiert. Da jedoch herausgefunden wurde, dass CpG mit der Erniedrigung der Expression von CCL21 und CCL19 das Milieu der umgebenden Lymphwege verändert, muss angenommen werden, dass die BM-DC nicht ausschließlich auf die Signalwirkung dieser CCL hin wandern. Das wäre durchaus plausibel, denn BM-DC sind aus Zellen aus dem Knochenmark generiert und ähneln möglicherweise mehr den Vorstufen der peripheren DC als diesen selber, weshalb sie andere CCR hochregulieren und auf deren Liganden reagieren. Potentielle Rezeptoren für die BM-DC könnten CCR2 und CCR6 sein, die im Rahmen von Atemwegsinfektionen für die Rekrutierung von DC in die Lungen von Mäusen nach Allergenexposition notwendig sind [85,88]. Als Antwort auf bakterielle Stimuli ist die Rekrutierung von Vorstufen CCR1 und CCR5 abhängig [88,99]. Ein Effekt von CpG auf diese Rezeptoren als Mechanismus für die Inhibition der Migration ist eher unwahrscheinlich. Unsere Ergebnisse deuten sogar auf eine Hochregulation der Rezeptoren hin, da nach CpG-Gabe sowohl die Rekrutierung von DC in die Lungen stark zunahm als auch die Migration der BM-DC unterstützt wurde.

In die Emigration der DC aus der Lunge in die mediastinalen LK sind neben CCR7 und seinen Liganden höchstwahrscheinlich noch weitere Moleküle involviert, die das Ziel der Wirkung von CpG sein könnten. Eventuell spielen der Rezeptor CXCR4 und sein Ligand CXCL12 auch in der Lunge eine Rolle wie sie für die Haut gezeigt worden ist. Dort tragen CCR7 und CXCR4 unabhängig voneinander zur Migration der dermalen DC in die drainierenden LK bei. LC reagieren chemotaktisch effektiver auf CXCL12 als auf CCL21, bevorzugen aber die Migration in Richtung CCL21, wenn sie simultan beiden Chemokinen ausgesetzt sind [56]. Würde CpG parallel zu CCL21 auch die Expression von CXCL12 herunterregulieren, könnte das die Migration fast vollständig inhibieren. Damit übereinstimmend wurde in unseren Versuchen die Migration der pulmonalen DC bis auf ein Grundniveau reduziert. Ebenfalls anhand der LC in der Haut wurde gezeigt, dass die Zellen durch Retentionssignale wie z.B. E-Cadherin solange in der Epidermis festgehalten werden, bis sie eine Unterbrechung dieser Verbindung zur Maturierung und Migration veranlasst

[54,106]. Die Verhinderung dieser Unterbrechung würde auch einen inhibitorischen Effekt auf die DC-Migration haben. Auf humanen LC wurde nachgewiesen, dass TGF- β die Expression von E-Cadherin auf DC-Vorstufen hochreguliert [27]. Die Expression von TGF- β könnte durch CpG induziert werden, was wieder für einen regulatorischen Mechanismus sprechen würde. Die nach CpG-Applikation in die Lunge rekrutierten DC würden dann aufgrund ihrer erhöhten Expression von E-Cadherin dort zurückgehalten.

4. Material und Methoden

4.1 Mausstämme

C57BL/6	(Charles River Laboratories, USA)
BALB/c	(Charles River Laboratories, USA)
DO11.10	exprimieren MHC-Klasse-II-restriktiven TCR (KJ1-26), der für das OVA-Peptid OVA ₃₂₃₋₃₃₉ spezifisch ist, BALB/c-Hintergrund (Jackson Laboratory, USA)
OT-I-Mäuse	exprimieren MHC-Klasse-I-restriktiven TCR (V α 2/V β 5.1), der für das OVA-Peptid OVA ₂₅₇₋₂₆₄ spezifisch ist, C57BL/6-Hintergrund (zur Verfügung gestellt von Prof. B. Heath, Walter & Eliza Hall Institut für Medizinische Forschung, Melbourne, Australien)
OT-II-Mäuse	exprimieren MHC-Klasse-II-restriktiven TCR (V α 2/V β 5.1), der für das OVA-Peptid OVA ₃₂₃₋₃₃₉ spezifisch ist, C57BL/6-Hintergrund (zur Verfügung gestellt von Prof. B. Heath, Walter & Eliza Hall Institut für Medizinische Forschung, Melbourne, Australien)
CCR7 ^{-/-} -Mäuse	für sieben Generationen zurückgekreuzt auf C57BL/6-Hintergrund [25], (zur Verfügung gestellt von Prof. R. Förster, Institut für Immunologie, Medizinische Hochschule Hannover)

Die Tiere wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen im zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover in einem regelmäßigen 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus bei 21 °C gehalten und gezüchtet. Die Mäuse wurden mit OVA-freiem Labortrockenfutter und Leitungswasser gefüttert.

Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit dem derzeit gültigen Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland (überarbeitete Fassung von 1998) nach Genehmigung durch die Veterinärbehörde der Bezirksregierung Hannover durchgeführt.

4.2 Materialien

4.2.1 Kulturmedien und Puffer

Komplettes RPMI (<i>Mausosmolarität</i>)	500 ml	RPMI1640 mit 25 mmol HEPES (Biochrom AG, Berlin)
	10%	FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
	2 nmol	L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin)
	1000 U	Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG, Berlin)
	2,5 µl	β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
	2,7 ml	1,68 M NaCl-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim)
	Komplettes IMDM	500 ml
10%		FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
2nmol		L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin)
1000 U		Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG, Berlin)
2,5 µl		β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
HF2.5	97,5 ml	MEM (Sigma-Aldrich, Steinheim)
	2,5 ml	FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
2% FCS-RPMI	98 ml	RPMI1640 mit 25 mmol HEPES (Biochrom AG, Berlin)
	2 ml	FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
Kaliumphosphatpuffer	1 ml	1,68 M Kaliumdihydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)
	4 ml	1,12 M Dikaliumhydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)
EDTA-BSS	1178 ml	destilliertes Wasser
	121 ml	1,68 M NaCl-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim)
	3 ml	1,68 M KCl-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim)
	2 ml	Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2
	12 ml	HEPES-Puffer, pH 7,2 (AppliChem, Darmstadt)
	70 ml	0,1 M EDTA, pH 7,2 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
EDTA-FCS	1 ml	0,1 M EDTA, pH 7,2 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
	10 ml	FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)

EDTA-BSS-FCS	5 ml	EDTA-FCS
	95 ml	EDTA-BSS
PBS	ohne Magnesium und Kalzium (Biochrom AG, Berlin)	
2% FCS-PBS	98 ml	PBS ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺ (Biochrom AG, Berlin)
	2 ml	FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
Lysis-Puffer	7,79 g	0,146 M NH ₄ Cl (Sigma-Aldrich, Steinheim)
	0,037 g	EDTA-Na ₂ (Sigma-Aldrich, Steinheim)
	1 g	NaHCO ₃ (Roth, Karlsruhe)
	mit 0,1 M HCl auf pH 7,3 eingestellt und auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt	

4.2.2 Reagenzien

Aluminiumhydroxid (Pierce Biotechnologie, Rockford, JL, USA)

Die Konzentration des vom Hersteller bezogenen Imject Alum liegt bei 40 mg/ml. Davon wurde durch 1:2,6 Verdünnung mit PBS eine Gebrauchslösung angesetzt, die 1,5 mg/100 µl Alum enthielt. Pro Maus wurden je 100 µl dieser Lösung dem experimentellen Ansatz entsprechend entweder mit 100 µl OVA Grad VI-Gebrauchslösung oder 100 µl PBS gemischt. Um die Adsorption des OVA an das Alum zu erreichen, wurde die Mischung 50-100-mal in einer Spritze durch eine enge Kanüle auf- und abgezogen.

anti IFN γ (Klon XMG1.2), (Becton, Dickinson (BD), NJ, USA)

Der Antikörper wurde ohne weitere Verdünnung in der Originalkonzentration von 0,5 µg/µl für die Th2-Zellkultur eingesetzt.

Bio Mag Goat Anti-Rat IgG (Qiagen GmbH, Hilden)

Die für die jeweilige Negativdepletion benötigte Menge an magnetischen Beads (Konzentration 1x10⁸/ml) wurde steril entnommen und dreimal mit EDTA-BSS-FCS gewaschen.

BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Von dem Protein wurde eine 5%ige Stammlösung in PBS angesetzt und steril filtriert. Diese Lösung wurde bei späterer Verwendung weiter mit PBS verdünnt.

Collagenase, Typ 3, (Worthington Biochemical Corporation, NJ, USA)

Das Enzym wurde in Mengen zu 7-9 mg portioniert und bei -20°C gelagert.

CFSE (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

Das Pulver, 25 mg, wurde in 1,8 ml DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim) gelöst, um eine 25 mmol Stammlösung zu erhalten und in Aliquots von 25 µl eingefroren. Zur Verwendung im Migrationsassay wurde die CFSE-Lösung durch Zugabe von 100 µl PBS pro Aliquot auf 5 mmol herunterverdünnt.

Für das Labeln von Zellen wurde eine 5 mmol Lösung mit DMSO angesetzt und in 30 µl Aliquots bei -20°C gelagert.

CpG-ODN 1668 (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin)

Die gelieferte Menge von 500 nmol wurde in 1 ml sterilem PBS gelöst. In allen Versuchen wurden den Mäusen davon jeweils 40 µl mit 20 nmol CpG appliziert. Die CpG-Gabe erfolgte immer intranasal unter einer leichten Narkose.

DNase I (Sigma-Aldrich, Steinheim)

100 mg lyophilisiertes Enzym wurden mit 1000 µl RPMI1640 durch leichtes Schwenken unter Vermeidung von Schaumbildung gelöst. Je 350 µl dieser Lösung wurden mit 50 ml RPMI1640 vermischt, in 1 ml-Aliquots aufgeteilt und bei -20°C eingefroren.

FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)

Das Serum wurde 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert und nach dem Abkühlen in 50 ml-Aliquots bei -20°C eingefroren.

GM-CSF

Das verwendete GM-CSF stammt aus dem Zellkulturüberstand von MEL-Zellen, die ein pEV-Puro-Plasmid mit dem Gen für die Expression von murinem GM-CSF tragen (zur Verfügung gestellt von Prof. Don Metcalf, Walter & Eliza Hall Institut für Medizinische Forschung, Melbourne, Australien). Die einzusetzende Konzentration des GM-CSF wurde durch Austestung im Vergleich mit rekombinantem murinen GM-CSF (BD, New Jersey, USA) ermittelt. Die aktuelle Charge war äquivalent zu 20 ng/ml rekombinantem GM-CSF, wenn der GM-CSF-enthaltende Zellkulturüberstand 1% des Kulturmediums repräsentierte.

Ketamin / Rompun

(Apotheke des Zentralen Tierlabors, Medizinische Hochschule, Hannover)

Ketamin (antiMedica GmbH, Senden-Bösensell) hatte eine Konzentration von 115,3 mg/ml. Die verwendete Rompun[®]2% Injektionslösung (Bayer, Leverkusen) enthielt pro ml 20 mg des Wirkstoffs Xylazin.

Zur Durchführung einer leichten Narkose vor intranasalen Applikationen wurden den Tieren 115 mg Ketamin und 4 mg Xylazin (200 µl 2% Rompun) pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. (Das entspricht z.B. bei einer Maus mit einem Gewicht von 25 g 2,9 mg Ketamin und 0,1 mg Xylazin.)

Die Überdosis Narkotikum setzte sich aus 5,77 mg Ketamin (50 µl) und 0,6 mg Xylazin (30 µl 2% Rompun) pro Maus zusammen.

MALP-2 (Prof. Dr. Peter F. Mühradt, BioTec Gründerzentrum, Braunschweig)

Das verwendete MALP-2 ist ein synthetisches Derivat: S-[2,3-bispalmitoyloxy-(2R)-propyl]-R-cysteinyl-amido-monomethoxyl polyethylene glycol (BppCysMPEG). Es lag in einer Konzentration von 1 mg/ml vor und wurde zur Applikation in PBS verdünnt.

Mikrosphäre-Beads (Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA)

Fluoresbrite® YG Microspheres der Größe 0,05 µm enthalten $3,64 \times 10^{14}$ Partikel/ml. Für die intranasale Applikation wurde die benötigte Menge steril entnommen und in PBS verdünnt.

Ovalbumin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Zum Sensibilisieren wurde OVA Grad VI verwendet. Davon wurde mit sterilem PBS eine Stammlösung mit der Konzentration 1 mg/ml angesetzt, die zu Mengen von je 100 µl aliquotiert und bei -20°C eingefroren wurde. Nach Zugabe von weiteren 900 µl PBS je Aliquot entstand daraus die Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 10 µg/100 µl.

OVA Grad VI wurde auch in den *in vitro* durchgeführten Proliferationsassays benutzt. Hier wurde mit RPMI1640 jeweils eine frische 1 mg/ml Lösung angesetzt, die dann im experimentellen Ansatz auf die Endkonzentration von 100 µg/ml verdünnt wurde.

Für die inhalative Antigenprovokation wurde aus OVA Grad V mit PBS eine 1%ige Lösung hergestellt, diese steril filtriert und in Form von 8 ml-Aliquots ebenfalls bei -20°C gelagert.

Für die intranasale Antigenapplikation wurden 5 mg OVA Grad V in 10 ml PBS gelöst, steril filtriert und aliquotiert bei -20°C eingefroren.

OVA-Peptide (BIOSYNTHAN GmbH, Berlin)

Den Peptiden liegen folgenden Aminosäuresequenzen zu Grunde: OVA₂₅₇₋₂₆₄: SIINFEKL, OVA₃₂₃₋₃₃₉: ISQAVHAAHAEINEAGR. Die Peptide wurden vom Hersteller in lyophilisierter Form in Mengen von 3-12 mg geliefert und so bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Lyophilisate in sterilem PBS gelöst, auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und als 20 µl-Aliquots wieder bei -20°C eingefroren. Während des Ansetzens der Experimente wurden die verwendeten Aliquots auf Eis gelagert.

rekombinantes IL-2 (BD, NJ, USA)

Das Cytokin wurde mit RPMI1640 auf eine Endkonzentration von 0,1 µg/ml verdünnt, zu je 30 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Diese Verdünnung entsprach annähernd einem Gehalt von 10 U/µl, da die spezifische Aktivität vom Hersteller mit $1-3 \times 10^8$ U/mg angegeben war.

rekombinantes IL-4 (BD, NJ, USA)

Der Inhalt des Röhrchens von 50 µl mit 10 µg IL-4 wurde in 1ml RPMI1640 gegeben. Die daraus resultierende Lösung von 10 ng/µl IL-4 wurde in 20 µl-Aliquots bei -80°C eingefroren. (Die verwendete Charge hatte eine spezifische Aktivität von $0,25-1 \times 10^8$ U/mg.)

Trypanblau (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Zur Anfärbung von Zellen zwecks Zählung in der Neubauerzählkammer wurde der Farbstoff 1:5 oder 1:10 verdünnt.

4.2.3 Nycodenz

30,55 g Nycodenz (AXIS-SHIELD, Oslo, Norwegen) wurden unter kontinuierlichem Rühren bei 4°C langsam und portionsweise in 100 ml deionisiertem Wasser gelöst. Die Dichte der Lösung wurde anhand einer Flasche mit definiertem Volumen bestimmt. Dazu wurde zuerst das Leergewicht der Flasche gemessen und dann die Flasche zusammen mit der eingefüllten Nycodenzlösung gewogen. Das daraus ermittelte Gewicht der Nycodenzlösung wurde durch das Volumen der Flasche dividiert. Die Dichte der Nycodenzlösung wurde gegen die Dichte des deionisierten Wassers bei 4°C, die vorher auf die gleiche Weise bestimmt worden war, korrigiert.

Zwischen den Messungen wurde die Flasche zur Dichtebestimmung mit 70%igem Ethanol und destilliertem Wasser gespült, in einem Wärmeschrank bei 60°C getrocknet und wieder auf eine Temperatur von 4°C gebracht.

Zur Einstellung der gewünschten Dichte wurde die Nycodenzlösung mit EDTA-BSS verdünnt, wobei die zuzugebende Menge EDTA-BSS nach folgender Formel berechnet wurde:

$$10 \times \text{aktuelle Dichte der Nycodenzlösung} + A = (10+A) \times \text{gewünschte Dichte}$$

Dabei ist A das Volumen an EDTA-BSS in ml, das je 10 ml Nycodenzlösung zugegeben werden muss.

Nach erneuter Bestimmung der Dichte der Nycodenzlösung wurde solange mit EDTA-BSS weiter verdünnt, bis die gewünschte Dichte erreicht war. Vor der letzten Zugabe von EDTA-BSS wurde die Osmolarität der Nycodenzlösung kontrolliert und gegebenenfalls durch Zugabe von destilliertem Wasser anstelle von EDTA-BSS auf den gewünschten Wert von 308 mOsm/l herunterkorrigiert:

benötigtes Volumen destilliertes Wasser =

$((\text{gemessene Osmolarität} - 308 \text{ mOsm/l}) / 308 \text{ mOsm/l}) \times \text{Volumen der Nycodenzlösung}$

Zur Isolierung von DC aus der Milz wurde Nycodenzlösung mit einer Dichte von $1,077 \text{ g/cm}^3$ und für Lungen-DC mit einer Dichte von $1,074 \text{ g/cm}^3$ angesetzt. Die fertige Nycodenzlösung wurde steril filtriert, in Mengen zu je 10 ml aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.4 Depletionscocktails

Anreicherung von Milz-DC und Lungen-DC:

Anti-Ery	(Klon TER-119, 0,8 mg/ml)	1:400
Anti-B220	(Klon RA3-6B2, 1,39 mg/ml)	1:1000
Anti-CD19	(Klon JD3, 0,78 mg/ml)	1:1000
Anti-Gr1	(Klon RB6-8C5, 2,54 mg/ml)	1:100
Anti-CD3	(Klon KT3-1.1, 0,78 mg/ml)	1:1000

Anreicherung von DC aus LK:

Anti-Ery	(Klon TER-119, 0,8 mg/ml)	1:400
Anti-B220	(Klon RA3-6B2, 1,39 mg/ml)	1:200
Anti-CD19	(Klon JD3, 0,78 mg/ml)	1:200
Anti-Gr1	(Klon RB6-8C5, 2,54 mg/ml)	1:400
Anti-CD3	(Klon KT3-1.1, 0,78 mg/ml)	1:200

Anreicherung von CD4⁺ T-Zellen

Anti-Ery	(Klon TER-119, 0,8 mg/ml)	1:500
Anti-Gr1	(Klon RB6-8C5, 2,54 mg/ml)	1:500
Anti-MHC-II	(Klon M5-114, 1,16 mg/ml)	1:500
Anti-CD19	(Klon JD3, 0,78 mg/ml)	1:500
Anti-B220	(Klon RA3-6B2, 1,39 mg/ml)	1:500

Bei allen Antikörpern für die drei vorherigen Cocktails handelt es sich um Ratte-anti-Maus-Antikörper, die in Hybridomazelllinien (zur Verfügung gestellt von Prof. B. Heath, Walter & Eliza Hall Institut für Medizinische Forschung, Melbourne, Australien) in unserer Arbeitsgruppe selbst kultiviert und aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt worden sind.

Anreicherung von CD8⁺ T-Zellen

Hierzu wurde der Cocktail aus dem Mouse CD8 T Lymphocyte Enrichment Set (BD, New Jersey, USA) verwendet, der die Antikörper gegen folgende Masantigene enthielt:

Anti-CD4	(Klon GK1.5)
Anti-CD11b	(Klon M1/70)
Anti-CD45R/B22	(Klon RA3-6B2)
Anti-CD49b	(Klon HM α 2)
Anti-Ery	(TER-119)

4.2.5 Antikörper für FACS

CCR7-Cy5PE	(Klon 4B12)	1:200	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD103-PE	(Klon M290)	1:400	BD, NJ, USA
CD11b-FITC	(Klon M1/70)	1:400	BD, NJ, USA
CD11c-APC	(Klon HL3)	1:400	BD, NJ, USA
CD11c-Cy7PE	(Klon HL3)	1:400	BD, NJ, USA
CD11c-FITC	(Klon HL3)	1:400	BD, NJ, USA
CD16/CD32	(Klon 2.4G2)	1:400	BD, NJ, USA
CD4-APC	(Klon RM4-5)	1:400	BD, NJ, USA
CD4-FITC	(Klon GK1.5)	1:400	BD, NJ, USA
CD4-PE	(Klon GK1.5)	1:400	BD, NJ, USA
CD80-PE	(Klon 16-10A1)	1:400	BD, NJ, USA
CD86-FITC	(Klon GL1)	1:400	BD, NJ, USA
CD8a-APC	(Klon 53-6.7)	1:400	BD, NJ, USA
CD8a-FITC	(Klon 53-6.7)	1:400	BD, NJ, USA
DO11.10-TCR-FITC	(Klon KJ1-26)	1:400	CALTAG, Burlingame, CA, USA
F4/80-PE	(Klon BM8)	1:400	CALTAG, Burlingame, CA, USA
IFN γ -PE	(Klon XMG1.2)	1:400	BD, NJ, USA
MHC-II-FITC	(Klon 2G9)	1:400	BD, NJ, USA
MHC-II-PE	(Klon M5/114.15.2)	1:400	BD, NJ, USA
V α 2-PE	(Klon B20.1)	1:800	BD, NJ, USA
V β 5-PE	(Klon MR9-4)	1:400	BD, NJ, USA

4.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte:

- Sezierbesteck: 8-11 cm große Scheren und Pinzetten (Carl-Martin-GmbH, Rietheim-Weilheim)
- Inhalationskammer aus Plexiglas, 325 x 200 x 100 mm (Zentrale Forschungswerkstätten, Medizinische Hochschule Hannover)
- Kompressor, PARI TurboBOY® (PARI GmbH, Starnberg)
- Vernebler, PARI LC Plus® (PARI GmbH, Starnberg)
- Laborlux K Mikroskop (Leitz, Wetzlar)
- Kamera Olympus DP71 (Olympus, Hamburg)
- Zählkammer mit 0,1 mm Tiefe und 0,0025 mm² Fläche (Neubauer, Marienfeld)
- Heraeus Multifuge 3 mit Schwenkrotor (ThermoFisher Scientific, Langenselbold)
- Tischzentrifuge 5415D (Eppendorf, Hamburg)
- Shandon Cytocentrifuge (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Sterile Werkbank: HERA safe 346 (Kendro, Hanau)
- Sanyo CO₂-Inkubator (Sanyo-Biomedical Produkte, EWALD GmbH, Bad Nenndorf)
- BD™ IMagnet (BD, NJ, USA)
- Durchflusszytometer, FACS Calibur von BD™ (BD, NJ, USA)
- Zellsortierung: FACS Aria von BD™ (BD, NJ, USA) und Mo-Flo (DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark)
- Software für FACS-Analyse: Summit Version 4.3 (DAKO, Glostrup, Dänemark)
- Thermocycler: iCycler (Bio-Rad, Hercules, USA)

Verbrauchsmaterialien:

- Infusionskanüle Introcan 18G x 1 3/4“ (Braun, Melsungen)
- 1 ml – Einwegspritzen: Omnifix® 100 Solo mit Kanülen: 100 Sterican 27G x 1/2“ (Braun, Melsungen)
- 76 x 26 mm geschliffene Objektträger mit Mattrand (Menzel GmbH, Braunschweig)

- für Shandon Cytozentrifuge: TPX Filterkarten, weiß, und TPX Probenkammern (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Chirurgische Klängen No.21 (Feather, Osaka, Japan)
- Polypropylen-Präzisions-Siebgewebe, 150 µm Maschenweite, (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)
- 35 x 10 mm und 60 x 15 mm Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht)
- 96-well-Rundbodenplatte für Suspensionszellen (Sarstedt, Nümbrecht)
- 6-well- Flachbodenplatte (Sarstedt, Nümbrecht)
- 25 cm² Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- 13 ml Rundbodenröhrchen, PP (Sarstedt, Nümbrecht)
- 5 ml Rundbodenröhrchen, PP und PS (Sarstedt, Nümbrecht)
- 0,5/ 1,5 und 2 ml Reagiergefäße (Sarstedt, Nümbrecht)
- 15 ml und 50 ml Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- 5, 10 und 25 ml Serologische Pipetten (Sarstedt, Nümbrecht)
- Multipette[®] plus mit 5 und 10 ml Combitips (Eppendorf, Hamburg)
- verstellbare 10, 100 und 1000 µl Research Pipetten (Eppendorf, Hamburg)
- 10, 100 und 1000 µl Biosphere Filter Tips, Typ Eppendorf, (Sarstedt, Nümbrecht)
- Transferpipette 3,5 ml, PP (Sarstedt, Nümbrecht)
- 150 mm Glaspasteurpipetten (Brand GmbH, Wertheim)
- Nalgene Aufsatzfilter mit 150 ml Flasche (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA)
- 0,2 µm Sterilfilter: Filtropur S 0,2 (Sarstedt, Nümbrecht)
- für FACS: 5 ml Rundbodenröhrchen, PS (BD, NJ, USA)
FACS Flow[™] (BD, NJ, USA)
- für RT-PCR: Optical 96-well reaction plates (Applied Biosystems, USA)
Optical Adhesive Cover Starter Kit (Applied Biosystems, USA)
Optical tape (BioRad, Hercules, USA)

4.4 Asthmamodelle

Klassisches Asthmamodell

Die Mäuse der Behandlungsgruppe und der positiven Kontrollgruppe wurden an Tag 1, 14 und 21 mit 10 µg OVA an 1,5 mg Alum in 200 µl PBS mittels intraperitonealer Injektion sensibilisiert. Negativen Kontrollmäusen wurden nur 1,5 mg Alum in 200 µl PBS injiziert. An Tag 28 und 29 wurden alle Tiere 20 min mit 1%iger OVA-Lösung inhalativ provoziert. Die Exposition erfolgte in einer geschlossenen quaderförmigen Plexiglasbox mit einem Volumen von 6,5 l, in der sich die Mäuse frei bewegen konnten, und durch die die mit Hilfe eines Verneblers (LC Plus®, PARI) zerstäubte OVA-Lösung geleitet wurde. Den Mäusen der Behandlungsgruppe wurden vor der ersten Antigenexposition unter einer leichten Narkose 20 nmol CpG in 40 µl PBS intranasal appliziert. Einen Tag nach der zweiten Exposition wurden alle Tiere durch eine Überdosis Ketamin/Rompun getötet und im Anschluss nach Eröffnung des Brustkorbs mittels Herzpunktion entblutet. Durch die freigelegte Trachea wurde eine Kanüle (Introcan 18G, Braun) eingeführt, über die die Lunge zweimal mit je 0,8 ml PBS gewaschen wurde. Danach erfolgte die Entnahme der Lunge mit anschließender Konservierung des Organs in 4%igem Formalin.

Th2-Asthmamodell

Den Tieren aller Gruppen (Negativkontrolle, Positivkontrolle und Behandlungsgruppe) wurden aus CD4⁺ Zellen kongenetischer Tierstämme generierter Th2-Zellen in einem Volumen von 200 µl PBS intravenös in die Schwanzvene transferiert. BALB/c-Mäuse erhielten 2 x 10⁶ aus DO11.10 generierte Th2-Zellen, BL6-Mäuse 4 x 10⁶ aus OT-II generierte Th2-Zellen. Vor dem Th2-Zelltransfer wurden den Tieren der Behandlungsgruppe unter leichter Narkose jeweils 20 nmol CpG in 40 µl PBS intranasal appliziert. An den darauffolgenden Tagen wurden die Tiere der positiven Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe je 20 min inhalativ mit 1%iger OVA-Lösung provoziert. Die Tiere der negativen Kontrollgruppe wurden nur PBS exponiert. Die Exposition erfolgte in der im klassischen Asthmamodell beschriebenen Plexiglaskammer. Die PBS- bzw. Allergenexpositionen wurden mit BALB/c-Mäusen dreimal und mit BL6-Mäusen fünfmal durchgeführt. In beiden Fällen wurden die Tiere einen Tag nach der letzten Exposition mit einer Überdosis Ketamin/Rompun getötet, anschließend entblutet und wie im klassischen Asthmamodell analysiert.

4.5 Analyse der BAL

Zunächst wurde die Menge der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit gemessen und zusammen mit der mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelten Anzahl Zellen pro ml die Gesamtzellzahl in der BAL berechnet. Anschließend wurde die BAL-Flüssigkeit 7 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -80°C eingefroren. Das Zellpellet wurde auf eine Konzentration von 150.000-200.000 Zellen/100 µl mit PBS eingestellt. Jeweils 100µl Zellsuspension wurden pro Spot durch Zentrifugation auf Objektträger aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte in einer Cytospin-Zentrifuge (Shandon) für 5 min bei 800 rpm.

Nach Trocknung der Objektträger über Nacht wurden die Präparate mit einer May-Grünwald-Färbung (Diff-Quik®, Düdingen, Schweiz) wie vom Hersteller beschrieben angefärbt. Die Differenzierung der Zellpopulationen erfolgte mikroskopisch bei einer Vergrößerung von 1:400, wobei je Spot 400 Zellen gezählt und den Subpopulationen der Makrophagen, Lymphozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten zugeordnet wurden.

4.6 Histologie

Die in 4% Formalin konservierten Mauslungen wurden in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden 4 µm starke Schnitte angefertigt und auf Objektträger gebracht. Zur Vorbereitung auf die Färbung wurden die Lungenschnitte mittels Xylol und fallender Ethanolreihe (100, 70, 50 und 30%) entparaffiniert und in deionisiertem Wasser hydriert. (Alle Geräte und Materialien: Labor der Abt.Funktionelle Anatomie 2).

Für die Beurteilung des Zellinflux wurden die Lungenschnitte mit Hämatoxin und Eosin (H&E, Merck) angefärbt. Bei einer Vergrößerung von 1:160 wurden von jedem gefärbten Lungenschnitt 4-6 verschiedene Stellen ausgewählt und die Inflammation sowohl peribronchial als auch perivaskulär beurteilt. Für den jeweiligen Lungenschnitt repräsentative Ausschnitte wurden photographisch dokumentiert.

4.7 Isolierung von T-Zellen

Zur Gewinnung von T-Zellen wurden den Mäusen die inguinalen, brachialen, axillaren, mesenterialen und zervikalen LK entnommen. Diese wurden gepoolt und durch ein Metallsieb in eine Petrischale mit 10 ml HF2,5 passiert. Die daraus resultierende Zellsuspension wurde durch auf- und abpipettieren vereinzelt und in ein 10 ml Röhrchen überführt. Danach wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, das Medium durch Zentrifugation abgetrennt und die Zellen einmal mit 2% FCS-PBS gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte, wie auch bei allen weiteren Zentrifugationsschritten, 7 min bei 1700 rpm und 4°C.

Das Zellpellet wurde in der entsprechenden Menge Depletionscocktail (siehe 4.2.4) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Für die Aufreinigung von OT-II und DO11.10 wurden 10 µl je 10⁶ Zellen und für die Aufreinigung von OT-I 2 - 2,5 µl je 10⁶ Zellen Depletionscocktail eingesetzt. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Röhrchen mit HF2,5 aufgefüllt und die Zellsuspension mit 1 ml FCS unterlegt.

Nach der darauf folgenden Zentrifugation wurde das Zellpellet in 500 µl Medium aufgenommen und in einem 5 ml Polystyrol-Röhrchen mit Sekundärantikörper-beschichteten magnetischen Beads gut vermischt. Im Fall von OT-II und DO11.10 wurden 2 Beads (Bio Mag, Qiagen) pro Zelle verwendet, die OT-I wurden nach Herstellerangaben mit der Beads-Suspension aus dem CD8 T Lymphocyte Enrichment Set (BD) vermischt. Die Mischung aus den Beads und den Zellen rotierte dann 15 min bei 4°C in einem 30° Winkel. Anschließend wurde das Röhrchen vorsichtig mit HF2,5 aufgefüllt und die Beads in einem Magneten von der Zellsuspension abgetrennt. Der Überstand mit den Zellen wurde in ein frisches Röhrchen überführt und mit HF2,5 gewaschen. Danach wurden die Zellen in komplettem RPMI aufgenommen.

Zur Bestimmung der Reinheit der isolierten T-Zellen wurde eine Probe entnommen, mit anti-Vα2 und anti-Vβ5 im Kombination mit anti-CD4 bzw. anti-CD8 gefärbt und per FACS analysiert. Die Reinheit der CD4⁺ T-Zellen lag bei 70-80%, die der CD8⁺ T-Zellen bei 85-95%.

4.8 Generierung von Th2-Zellen

Aus den Milzen von BALB/c oder DO11.10 isolierte DC und T-Zellen von DO11.10-Mäusen bzw. DC von BL6 und T-Zellen von OT-II wurden im Verhältnis 1:5 in komplettem RPMI kokultiviert. Dem Medium wurden 10 U/ml IL-2, 10 ng/ml IL-4, 0,5 µg/ml anti-IFN γ und 1 µg/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid zugegeben. Die Ansätze wurden, auf 25 cm²-Zellkulturflaschen verteilt, in den ersten 24 h stehend und danach liegend im Inkubator gelagert. Die Kultivierung erfolgte über vier Tage bei 37°C und 5% CO₂ in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre.

Nach der Kokultivierung wurden die Th2-Zellen zweimal mit 30-37°C warmem PBS gewaschen und für den Transfer in einer adäquaten Menge PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Reinheit der Th2-Zellen wurde eine Probe nach anti-CD4/anti-DO11.10-TCR-Färbung mittels FACS analysiert. Der Anteil DO11.10-TCR⁺ Th2 lag zwischen 80-90%.

4.9 IL-4 – ELISpot-Assay

Die Analyse der IL4-Expression der T-Zellen wurde mit dem Testkit ELISpotPLUS for Mouse Interleukin-4, MABTECH AB, Schweden, entsprechend der Testanleitung durchgeführt:

Die *PVDF-based membrane plate, type ELIIP*, wurde am Vortag 2 min mit 70% Ethanol aktiviert, 5 mal mit sterilem Wasser gewaschen und über Nacht mit dem primären anti-IL4-Antikörper (mAB 11B11) in einer Konzentration von 15 µg/ml in PBS inkubiert.

Nach Entfernung des überschüssigen Primärantikörpers und 5-maligem Waschen mit sterilem PBS wurde die Platte mit komplettem RPMI 60 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Das Medium wurde entfernt und je 250.000 in komplettem RPMI resuspendierte T-Zellen in die Vertiefungen gegeben. Zur Restimulation wurden die T-Zellen mit je 50.000 DC kokultiviert und das Medium mit 1 µg/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid versetzt. Die Inkubation der Platte erfolgte 22 h bei 37°C und 5% CO₂ in einem feuchtigkeitsgesättigten Inkubator.

Nach der Kultivierung wurden die Zellen entfernt und die Platte 5 mal mit PBS gewaschen. Dann wurde die Platte 2 h mit dem sekundären Antikörper BVD6-24G2-Biotin in einer Konzentration von 1 µg/ml in 0,5% FCS enthaltendem PBS inkubiert und erneut 5 mal mit PBS gewaschen. Danach folgte 1 h Inkubation mit 1:1000 in 0,5% FCS enthaltendem PBS verdünnter Streptavidin-Alkaline Phosphatase und anschließendem Waschschrift. Als letztes wurde das Substrat, BCIP/NBT-plus, zugegeben und nach der sichtbaren Entwicklung der Spots nach 20 min unter fließendem Leitungswasser wieder abgewaschen. Die Platte wurde nach dem Trocknen in einem ELISpot-Lesegerät ausgewertet.

4.10 Isolierung von dendritischen Zellen

Isolierung von DC aus der Milz

Die entnommenen Milzen wurden frei von Fett- und Bindegewebsresten präpariert und in ein Röhrchen mit 6 ml komplettem 2% FCS-RPMI gegeben. Anschließend wurden die Organe mit dem Medium in eine Petrischale überführt und mit einem Skalpell in möglichst kleine Stücke zerteilt. Der Verdau wurde dann wieder im Röhrchen durchgeführt, wozu den 6 ml Medium mit dem zerkleinerten Milzgewebe 1 ml Verdauungsmix zugefügt wurde. Für den Verdauungsmix wurde jeweils ein 1 ml DNase-Aliquot mit 7 mg Collagenase vermischt, um im Endvolumen Konzentrationen von 0,1% DNase und 1 mg/ml Collagenase zu erreichen. Während des Verdaus, der 25 min bei Raumtemperatur erfolgte, wurde die Suspension mit einer Pasteurpipette kontinuierlich auf- und abpipettiert. Vor den letzten 5 min wurden 0,6 ml 0,1 M EDTA-Lösung zugegeben, um einerseits die DC von interzellulären Kontakten mit T-Zellen freizusetzen und andererseits die enzymatische Reaktion zu stoppen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension durch Siebgewebe filtriert, mit komplettem Medium auf 9 ml aufgefüllt und mit 1 ml kaltem EDTA-FCS unterlegt, und dann 7 min bei 1700 rpm zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis.

Das Zellpellet, aus dem Parenchym von maximal vier Milzen, wurde in 5 ml 4°C kalter Nycodenzlösung der Dichte 1,077 g/cm³ resuspendiert. Mit dieser Suspension wurden weitere 5 ml Nycodenz in einem 15 ml Rundbodenröhrchen vorsichtig überschichtet und die Suspension anschließend mit 1-2 ml EDTA-FCS überlegt. Zur Erzeugung eines leichten Gradienten wurde eine Glaspasteurpipette einmal kurz durch die drei Flüssigkeitsschichten gezogen. Danach erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 1700 g in einer auf 4°C heruntergekühlten Zentrifuge mit Schwenkbecherrotor. Nach der Zentrifugation zeichnete sich in der oberen Nycodenzschicht ein diffuser weißer Ring ab, der zu 50-80% DC enthielt. Die Lösung wurde bis auf verbleibende 4 ml abgenommen, in ein 15 ml Spitzbodenröhrchen überführt, mit EDTA-BSS-FCS aufgefüllt und bei 1500 rpm 7 min zentrifugiert. Zur vollständigen Elimination des Nycodenz wurden die angereicherten Zellen ein zweites Mal mit EDTA-BSS-FCS gewaschen, davor wurde ihre Anzahl bestimmt.

Je 10⁶ Zellen wurden 10 µl Depletionscocktail zu dem Pellet gegeben. Die Suspension wurde mit einer 1000 µl-Pipette gut gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 9 ml EDTA-BSS-FCS aufgefüllt und zur Zurückhaltung von nichtgebundenen Antikörpern mit 1 ml FCS unterlegt. Es folgten 7 min Zentrifugation bei 1500 rpm. Das Zellpellet wurde in 500 µl EDTA-BSS-FCS aufgenommen und in einem 5 ml Polystyrol-Röhrchen mit den Sekundärantikörper-beschichteten magnetischen Beads (Bio

Mag, Qiagen), je 2 Beads pro Zelle, gut vermischt. Die Mischung aus den Beads und den Zellen rotierte dann 15 min bei 4°C in einem 30° Winkel. Anschließend wurde das Röhrchen vorsichtig mit EDTA-BSS-FCS aufgefüllt und die Beads in einem Magneten von der Zellsuspension abgetrennt. Der Überstand mit den Zellen wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt, mit EDTA-BSS-FCS aufgefüllt, mit 1 ml EDTA-FCS unterlegt und 7 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden bis zur Weiterverwendung in 1 ml EDTA-BSS-FCS aufgenommen und auf Eis gelagert. Zur Bestimmung der Reinheit der isolierten DC wurde eine Probe entnommen, mit anti-CD11c-FITC gefärbt und per FACS analysiert.

Isolierung von DC aus der Lunge

Die entnommenen Lungen wurden durch Abtupfen auf sterilen Mullkompressen von anhaftendem Blut befreit und in 6 ml 2% FCS-RPMI gegeben. Die Organe wurden mit einer Schere in möglichst kleine Stücke zerschnitten und ebenso wie das Milzgewebe mit einem DNase/Collagenase-Mix verdaut. Die Anreicherung der Zellen erfolgte mit Nycodenzlösung einer Dichte von 1,074 g/cm³ nach der gleichen Prozedur wie sie für die Isolierung von Milz-DC beschrieben wurde. Für die Verwendung zur Bestimmung von Oberflächenmolekülen wurden die Zellen nach dem Schritt des Nycodenzgradienten direkt zur Antikörperfärbung eingesetzt. Sollten die Lungen-DC in Proliferationsassays eingesetzt werden, wurde das Zellpellet mit anti-CD11c-FITC/anti-MHC-II-PE gefärbt, in 500 µl EDTA-BSS-FCS aufgenommen und der Zellsortierung zugeführt. Die sortierten Zellen wurden in komplettem RPMI resuspendiert.

Isolierung von DC aus den LK

Die entnommenen LK wurden durch Abtupfen auf sterilen Mullkompressen von anhaftendem Blut befreit und pro Maus in 2-3 ml 2% FCS-RPMI gesammelt. Die LK wurden mit Hilfe von Pinzetten aufgebrochen und die Zellen mechanisch vereinzelt. Die Zellsuspension wurde zweimal mit EDTA-BSS-FCS durch 7 min Zentrifugation bei 1500 rpm gewaschen. Danach wurde das Zellpellet in 500 µl EDTA-BSS-FCS aufgenommen und die DC nach Anfärbung mit anti-CD11c-FITC durch Zellsortierung angereichert.

In den Optimierungsexperimenten wurden die LK teilweise verdaut und die Zellsuspensionen anschließend durch einen Depletionsschritt angereichert. In diesem Fall wurde das Protokoll für die Isolierung von DC aus der Milz angewendet, mit der Änderung, dass sämtliche Volumina nur zu 1/6 der angegebenen Menge eingesetzt wurden. Für die Depletion wurde ein Cocktail mit anderen Antikörperkonzentrationen verwendet (siehe 4.2.4), von dem ebenfalls 10 µl pro 10⁶ Zellen benutzt wurden.

4.11 Generierung von BM-DC

BL6-Mäusen wurden Femur und Tibia entnommen, von Muskelgewebe und Sehnen freipräpariert und in eine Petrischale mit 2% FCS-PBS überführt. Danach wurden beidseitig die Enden der Knochen abgetrennt und das Knochenmark mit Hilfe einer Einwegspritze in 10 ml komplettem IMDM herausgespült. Durch Auf- und Abpipettieren der Suspension wurden die Zellen vereinzelt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1700 rpm wurde das Medium entfernt und das Zellpellet in 1-2 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Um die Erythrozyten zu lysieren, wurden die Knochenmarkszellen 1 min bei Raumtemperatur in dem Puffer inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 10 ml 2% FCS-PBS gestoppt. Danach wurde die Zellsuspension durch Siebgewebe filtriert, erneut zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in komplettem IMDM aufgenommen. Dabei wurden die Zellen auf eine Dichte von 1×10^6 /ml Medium eingestellt, zusätzlich wurde dem Medium 1% GM-CSF zugesetzt. Jeweils 3 ml dieser Zellsuspensionen wurden in die Vertiefungen einer 6-well-Platte gegeben und bei 37°C, 5% CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am dritten, fünften und siebenten Tag der Kultivierung wurde das Medium durch frisches komplettes IMDM mit 1% GM-CSF ersetzt. Die generierten BM-DC konnten ab dem 7.Tag verwendet werden und wurden nicht länger als bis zu 9 Tagen in der Kultur belassen.

Für die Restauration der Antigenpräsentation in den mediastinalen LK wurden die BM-DC zweimal mit EDTA-BSS-FCS gewaschen und anschließend für den intranasalen Transfer in PBS resuspendiert. Die Konzentration der BM-DC wurde so eingestellt, dass die zu transferierende Anzahl in 50 µl PBS enthalten war.

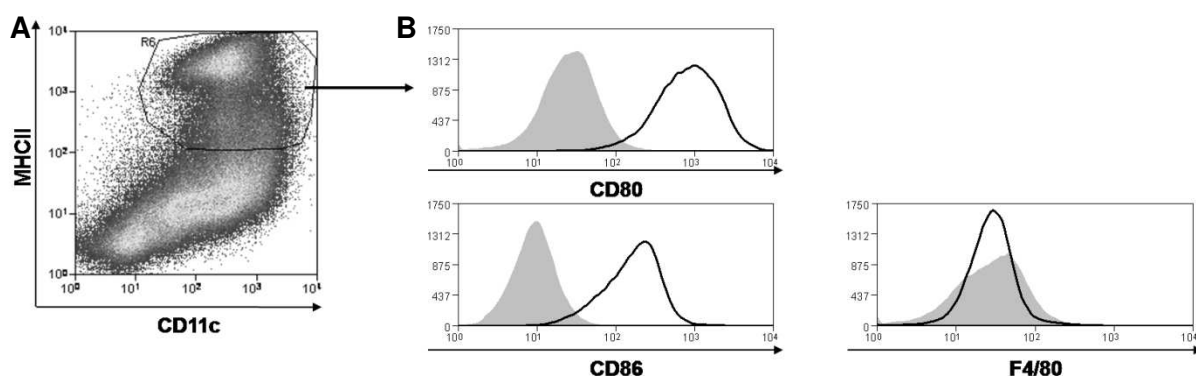


Abb.4.1 Phänotyp der generierten BM-DC. A) In der Dot-Plot ist der Anteil CD11c⁺ MHC-II⁺ DC nach 7 Tagen Kultivierung von Knochenmarkszellen mit GM-CSF zu sehen. B) Die Histogramme zeigen die Expression der Oberflächenmarker CD80, CD86 und F4/80 verglichen mit der Hintergrundfärbung CD11c-APC/MHC-II-FITC (graue Kurven).

Zur Charakterisierung wurden die Zellen mit anti-CD11c, anti-MHC-II sowie den jeweiligen PE-gelabelten Antikörpern gegen CD80, CD86 und F4/80 gefärbt. Von den generierten BM-DC waren im Durchschnitt 30-40% CD11c⁺ MHC-II⁺. Diese DC exprimierten in hohem Maße die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Der Makrophagenmarker F4/80 ließ sich dagegen auf ihrer Oberfläche nicht nachweisen (Abb.4.1). In den durchgeführten Experimenten wurde die vollständige Population der generierten BM-DC verwendet und die Anzahl der zu transferierenden Zellen entsprechend des Anteils der CD11c⁺ MHC-II⁺ Zellen berechnet.

4.12 Antikörperfärbung und Zellsortierung

Für die Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen wurden die zu untersuchenden Zellen in 2% FCS-PBS resuspendiert und 30 min mit den entsprechenden gelabelten Antikörpern in der optimierten Verdünnung (siehe 4.2.5) bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 200-300 µl PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch ausgewertet. Zum Vergleich wurden entweder ungefärbte Zellen oder mit einer Isotypkontrolle gefärbte Zellen mitanalysiert.

Die Zellsortierung wurde hier vorwiegend bei DC angewendet. Die Antikörperfärbung dieser Zellen wurde wie oben beschrieben durchgeführt, dabei wurden die DC jedoch in EDTA-BSS inkubiert. In die Auffangröhrchen wurden jeweils 500 µl EDTA-BSS vorgelegt. Die Zellsortierung erfolgte in der dafür spezialisierten Arbeitsgruppe der Medizinischen Hochschule Hannover. Die sortierten Zellen wurden sofort 7 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und in einer adäquaten Menge komplettem RPMI resuspendiert.

4.13 Labeln von Zellen mit CFSE

Sowohl T-Zellen als auch BM-DC wurden in 1 ml 0,1% BSA in PBS-Lösung resuspendiert. Pro 10⁷ Zellen wurde 1 µl 5 mmol CFSE verwendet. Der Farbstoff wurde auf halber Höhe des Röhrchens an den Rand pipettiert und durch vortexen umgehend mit der Zellsuspension vermischt. Die Zellen wurden dann 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend zweimal mit HF2,5 (T-Zellen) oder EDTS-BSS-FCS (BM-DC) gewaschen. Für den *in vitro*-Proliferationsassay vorgesehene T-Zellen wurden danach in komplettes RPMI aufgenommen. Zu transferierende T-Zellen und BM-DC wurden in der adäquaten Menge PBS resuspendiert.

4.14 Proliferationsassays

In vivo

2-3 x 10⁶ CFSE-gelabelte T-Zellen (OT-I oder OT-II) in 200 µl PBS wurden i.v. in die Schwanzvenen der Mäuse injiziert, die dem experimentellen Ansatz entsprechend 24 h zuvor 20 nmol CpG, 1 µg MALP-2 oder 40 µl PBS intranasal appliziert bekommen hatten. Danach wurden die Mäuse in einer geschlossenen Plexiglasbox, wie unter 4.4 beschrieben, 20 min inhalativ mit 1% OVA in PBS provoziert, die Exposition wurde am nächsten Tag wiederholt. 60 Stunden nach der ersten Provokation wurden die Tiere durch zerebrale Dislokation getötet, die mediastinalen sowie die inguinalen LK entnommen und separat für jede Maus in Petrischalen mit 3 ml HF2,5 gegeben. Die LK wurden mit Pinzetten aufgebrochen und die Zellen mechanisch vereinzelt. Die Zellsuspensionen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit je 100 µl in 2% FCS-PBS verdünntem anti-CD4-APC bzw. anti-CD8-APC gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen, je nach Anzahl, in 600-1000 µl PBS resuspendiert und vollständig am Durchflusszytometer aquiriert. Bei der Analyse wurden CD4⁺ CFSE^{low} bzw. CD8⁺ CFSE^{low} Zellen als proliferierte Zellen bewertet.

In Vitro

In einer 96-well-Rundbodenplatte wurden jeweils 10.000 DC pro Vertiefung in einem Endvolumen von 200 µl in komplettem RPMI dem experimentellen Ansatz entsprechend mit 100 mg/ml OVA-Protein, 1µg/ml OVA-Peptid oder ohne Antigen inkubiert. Die Inkubation erfolgte 45-60 min bei 37°C und 5% CO₂ in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre. Aus den LK von wt-Mäusen konnten teilweise nicht genügend DC isoliert werden. Dann wurden im gesamten Ansatz für die Inkubation mit OVA-Peptid jeweils nur 5.000 DC genommen.

Nach der Inkubation wurde die Rundbodenplatte 7 min bei 1500 rpm zentrifugiert und anschließend das Medium abgenommen. Es folgten zwei Waschschrte mit je 200 µl Medium pro Vertiefung. Danach wurden je 50.000 CFSE-gelabelte T-Zellen (OT-I, OT-II bzw. DO11.10) in 200 µl komplettem RPMI direkt auf die Pellets der DC gegeben. Die DC wurden mit den T-Zellen 60 Stunden unter den oben genannten Bedingungen kokultiviert.

Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium wieder entfernt, die Zellen zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen und die Zellpellets in der Rundbodenplatte auf einem Vortexer kurz aufgerüttelt. Daran anschließend wurden die T-Zellen mit anti-CD8-APC (OT-I) bzw. anti-CD4-APC (OT-II und DO11.10), jeweils 50 µl einer 1:400-Verdünnung pro Vertiefung, gefärbt. Nach dem finalen Waschschrte wurden die Zellen in je 200 µl PBS resuspendiert und im FACS Calibur vollständig analysiert. Wie bei der Auswertung der *in vivo*-Proliferation zählten CD8⁺ CFSE^{low} bzw. CD4⁺ CFSE^{low} Zellen als proliferierte Zellen.

4.15 Migrationsassays

CFSE. Den Mäusen, die dem experimentellen Ansatz entsprechend 24 h zuvor intranasal PBS oder CpG bekommen hatten, wurden unter einer leichten Narkose mit Ketamin/Rompun 50 µl 5 mmol CFSE-Lösung intranasal appliziert. 18 h nach der Instillation wurden den Tieren die mediastinalen LK entnommen und jeweils für die Mäuse einer Gruppe in 2-3 ml 2% FCS-RPMI gesammelt. Die LK wurden mit Pinzetten aufgebrochen, die Zellen mechanisch vereinzelt und das Medium 7 min bei 1500 rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, gezählt und anschließend mit je 100 µl in 2% FCS-PBS verdünntem anti-CD11c-APC gefärbt. Bei der FACS-Analyse wurde ungefähr je ein Drittel der pro Gruppe gepoolten Proben aquiriert. Damit wurde der Anteil CD11c⁺ CFSE⁺ Zellen bestimmt und die Anzahl dieser Zellen über die gezählte Gesamtzellzahl berechnet. Die ermittelten Werte wurden in jeder Gruppe durch die Anzahl der Tiere geteilt.

Beads. Die gelbgrün fluoreszierenden Mikrosphäre-Beads wurden mit PBS so verdünnt, dass 5×10^{12} Beads in 50 µl PBS enthalten waren. Diese Anzahl wurde dann jeweils in 24 h zuvor mit PBS oder CpG behandelte Mäuse unter leichter Narkose intranasal transferiert. 18 h später wurden die Lungen sowie die mediastinalen LK entnommen. Die mediastinalen LK wurden für jedes Tier einzeln analysiert. Dabei wurden die LK wie bei der Durchführung des Migrationsassays mit CFSE beschrieben behandelt. In der FACS-Analyse wurden die CD11c⁺ Zellen auf das Vorhandensein der in Kanal FL1 zu detektierenden gelbgrünen Fluoreszenz untersucht. Die Lungen der Mäuse wurden gepoolt und pro Gruppe in 6 ml 2% FCS-RPMI gegeben. Aus den Lungen der Tiere wurden die DC isoliert (siehe 4.10) und direkt nach dem Nycodenzschritt unsortiert mit anti-CD11c-APC und anti-MHC-II-PE angefärbt. In der anschließenden FACS-Auswertung wurde die gelbgrüne Fluoreszenz der CD11c⁺ MHC-II⁺ Zellen analysiert.

BM-DC. Die nach 7 Tagen Kultivierung generierten BM-DC wurden einmal mit PBS gewaschen und als ganze Population mit CFSE gelabelt (siehe 4.13). Danach wurden die Zellen in PBS resuspendiert und die Verdünnung so eingestellt, dass 50 µl PBS 4-5 $\times 10^5$ CD11c⁺ MHC-II⁺ BM-DC enthielten. Diese Menge wurde unter leichter Narkose in 24 h zuvor mit 40 µl PBS oder 20 nmol CpG behandelte Mäuse intranasal transferiert. 18 h danach wurden die mediastinalen LK entnommen, je Tier in 2-3 ml 2% FCS-RPMI gegeben und die Zellen mit Hilfe von Pinzetten mechanisch vereinzelt. Die Zellsuspensionen wurden einmal mit PBS gewaschen, mit anti-CD11c-APC angefärbt und im FACS vollständig aquiriert und analysiert. Die wiedergefundenen BM-DC stellten sich als Population CFSE-markierter Zellen innerhalb der CD11⁺ Zellen dar.

4.16 RT-PCR

BL/6 Mäuse wurden intranasal mit 40 µl PBS oder 20 nmol CpG behandelt. 24 h später wurden den Tieren die mediastinalen LK sowie ungefähr 3 x 3 mm große Stücke Lungengewebe entnommen. Sofort nach der Entnahme wurden jeweils die LK eines Tieres in 200 µl und das Lungengewebe in 350 µl RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Hilden) überführt und 1 h bei Raumtemperatur belassen. Es folgten die Lagerung über Nacht im Kühlschrank und anschließendes Einfrieren bei -20°C bis zur weiteren Verwendung.

Die Extraktion der gesamten RNA wurde mit dem RNeasy® Protect Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers inklusive des optionalen DNase-Verdau durchgeföhrt. Für die Synthese der cDNA wurde das Omniscript® RT Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Hierbei wurde vor dem Ansetzen der Reaktion ein zusätzlicher Denaturierungsschritt über 5 min bei 65°C durchgeföhrt. Es wurden sowohl Oligo(dT)-Primer als auch Random-Primer eingesetzt. Neben der im Herstellerprotokoll vorgegebenen Inkubation von 60 min bei 37°C wurde der Reaktionsmix vorher 10 min bei 25°C und danach 10 min bei 95°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde dann auf 4°C herunter geköhlt.

Die quantitative RT-PCR wurde mit dem QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Hilden) in einem iCycler (Bio-Rad) in Triplikaten durchgeföhrt. Entgegen dem Herstellerprotokoll wurde die Reaktion nur in einem Volumen von 25 µl angesetzt. Es wurden Primer-Paare verwendet, die vor kurzem publiziert worden waren [82]:

CCL19 (*vorwärts*: ctgcctcagattatctgccat, *rückwärts*: tcattagcacccccagagt)

CCL21 (*vorwärts*: ccctggaccaaggcagt, *rückwärts*: aggcttagagtgtccggg)

HPRT (*vorwärts*: aggttgcaagcttgctggt, *rückwärts*: tgaagtactcattatagtcaagggca)

Dem ersten Amplifikationszyklus wurde eine 15-minütige Inkubation bei 95°C zur Aktivierung der HotStarTaq® DNA-Polymerase vorgeschaltet. Die Konditionen für die folgenden 42 Zyklen waren 30 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Hybridisierung der Primer bei 58°C und 30 s DNA-Polymerisation bei 72°C. Nach der RT-PCR wurde die Reinheit der Produkte durch Analyse ihrer Schmelzkurven getestet. Ebenso wurde die Spezifität der PCR-Produkte mit einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte relativ. Dazu wurde für jeden Parameter eine Standardkurve aus 1:1, 1:5 und 1:25 verdünnter cDNA erstellt. Die daraus ermittelten abstrakten Werte für die Gene von CCL19 und CCL21 wurden durch die entsprechenden Werte des Referenz-Gens HPRT dividiert.

4.17 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit der Software PRISM 4 von GraphPad durchgeführt. In den Experimenten mit drei zu vergleichenden Gruppen wurden die statistischen Daten mit dem ANOVA-Test und nachgestelltem Bonferroni-Test ermittelt. Anderenfalls wurde der Student's t-Test angewandt. Hierfür wurden die Daten jeweils logarithmisiert, wenn die Anzahl der unabhängigen Ergebnisse kleiner als 10 war. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

5. Literaturverzeichnis

1. Agrawal, S. and E. R. Kandimalla. 2007. Synthetic agonists of Toll-like receptors 7, 8 and 9. *Biochem.Soc.Trans.* 35:1461-1467.
2. Alvarez, D., E. H. Vollmann, and U. H. von Andrian. 2008. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity.* 29:325-342.
3. Ashino, S., D. Wakita, Y. Zhang, K. Chamoto, H. Kitamura, and T. Nishimura. 2008. CpG-ODN inhibits airway inflammation at effector phase through down-regulation of antigen-specific Th2-cell migration into lung. *Int.Immunol.* 20:259-266.
4. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 18:767-811.
5. Banerjee, B., K. J. Kelly, J. N. Fink, J. D. Henderson, Jr., N. K. Bansal, and V. P. Kurup. 2004. Modulation of airway inflammation by immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of allergic aspergillosis. *Infect.Immun.* 72:6087-6094.
6. Beaty, S. R., C. E. Rose, Jr., and S. S. Sung. 2007. Diverse and potent chemokine production by lung CD11b^{high} dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J.Immunol.* 178:1882-1895.
7. Belz, G. T., C. M. Smith, L. Kleinert, P. Reading, A. Brooks, K. Shortman, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2004. Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:8670-8675.
8. Boonstra, A., R. Rajsbaum, M. Holman, R. Marques, C. Asselin-Paturel, J. P. Pereira, E. E. Bates, S. Akira, P. Vieira, Y. J. Liu, G. Trinchieri, and A. O'Garra. 2006. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J.Immunol.* 177:7551-7558.
9. Borkowski, T. A., J. J. Letterio, A. G. Farr, and M. C. Udey. 1996. A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J.Exp.Med.* 184:2417-2422.

10. Broide, D. H., G. Stachnick, D. Castaneda, J. Nayar, M. Miller, J. Y. Cho, M. Roman, J. Zubeldia, T. Hayashi, and E. Raz. 2001. Systemic administration of immunostimulatory DNA sequences mediates reversible inhibition of Th2 responses in a mouse model of asthma. *J.Clin.Immunol.* 21:175-182.
11. Broide, D., J. Schwarze, H. Tighe, T. Gifford, M. D. Nguyen, S. Malek, J. Van Uden, E. Martin-Orozco, E. W. Gelfand, and E. Raz. 1998. Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J.Immunol.* 161:7054-7062.
12. Brokaw, J. J., G. W. White, P. Baluk, G. P. Anderson, E. Y. Umemoto, and D. M. McDonald. 1998. Glucocorticoid-induced apoptosis of dendritic cells in the rat tracheal mucosa. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 19:598-605.
13. Busse, W. W. and R. F. Lemanske, Jr. 2001. Asthma. *N.Engl.J.Med.* 344:350-362.
14. Byersdorfer, C. A. and D. D. Chaplin. 2001. Visualization of Early APC/T Cell Interactions in the Mouse Lung Following Intranasal Challenge. *J. Immunol.* 167: 6756–6764.
15. Chen, L., M. Arora, M. Yarlagadda, T. B. Oriss, N. Krishnamoorthy, A. Ray, and P. Ray. 2006. Distinct responses of lung and spleen dendritic cells to the TLR9 agonist CpG oligodeoxynucleotide. *J.Immunol.* 177:2373-2383.
16. Chiamonte, M. G., M. Hesse, A. W. Cheever, and T. A. Wynn. 2000. CpG oligonucleotides can prophylactically immunize against Th2-mediated schistosome egg-induced pathology by an IL-12-independent mechanism. *J.Immunol.* 164:973-985.
17. Cho, J. Y., M. Miller, K. J. Baek, J. W. Han, J. Nayar, M. Rodriguez, S. Y. Lee, K. McElwain, S. McElwain, E. Raz, and D. H. Broide. 2004. Immunostimulatory DNA inhibits transforming growth factor-beta expression and airway remodeling. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 30:651-661.
18. Cohn, L., J. S. Tepper, and K. Bottomly. 1998. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *J.Immunol.* 161:3813-3816.
19. Cohn, L., R. J. Homer, A. Marinov, J. Rankin, and K. Bottomly. 1997. Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J.Exp.Med.* 186:1737-1747.

20. Cook, D. N. and K. Bottomly. 2007. Innate immune control of pulmonary dendritic cell trafficking. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 4:234-239.
21. de Heer, H. J., H. Hammad, T. Soullie, D. Hijdra, N. Vos, M. A. Willart, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2004. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J.Exp.Med.* 200:89-98.
22. Eisenbarth, S. C., A. Zhadkevich, P. Ranney, C. A. Herrick, and K. Bottomly. 2004. IL-4-dependent Th2 collateral priming to inhaled antigens independent of Toll-like receptor 4 and myeloid differentiation factor 88. *J.Immunol.* 172:4527-4534.
23. Fanucchi, M. V., E. S. Schelegle, G. L. Baker, M. J. Evans, R. J. McDonald, L. J. Gershwin, E. Raz, D. M. Hyde, C. G. Plopper, and L. A. Miller. 2004. Immunostimulatory oligonucleotides attenuate airways remodeling in allergic monkeys. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 170:1153-1157.
24. Forster, R., A. C. Davalos-Misnitz, and A. Rot. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat.Rev.Immunol.* 8:362-371.
25. Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell.* 99:23-33.
26. Gauvreau, G. M., E. M. Hessel, L. P. Boulet, R. L. Coffman, and P. M. O'Byrne. 2006. Immunostimulatory sequences regulate interferon-inducible genes but not allergic airway responses. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 174:15-20.
27. Geissmann, F., P. Revy, A. Regnault, Y. Lepelletier, M. Dy, N. Brousse, S. Amigorena, O. Hermine, and A. Durandy. 1999. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J.Immunol.* 162:4567-4575.
28. Geissmann, F., S. Jung, and D. R. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 19:71-82.
29. GeurtsvanKessel, C. H., M. A. Willart, L. S. van Rijt, F. Muskens, M. Kool, C. Baas, K. Thielemans, C. Bennett, B. E. Clausen, H. C. Hoogsteden, A. D. Osterhaus, G. F. Rimmelzwaan, and B. N. Lambrecht. 2008. Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin⁺CD11b⁻ but not plasmacytoid dendritic cells. *J.Exp.Med.* 205:1621-1634.

30. Gunn, M. D., S. Kyuwa, C. Tam, T. Kakiuchi, A. Matsuzawa, L. T. Williams, and H. Nakano. 1999. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J.Exp.Med.* 189:451-460.
31. Hacker, H., H. Mischak, T. Miethke, S. Liptay, R. Schmid, T. Sparwasser, K. Heeg, G. B. Lipford, and H. Wagner. 1998. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 17:6230-6240.
32. Hacker, H., R. M. Vabulas, O. Takeuchi, K. Hoshino, S. Akira, and H. Wagner. 2000. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J.Exp.Med.* 192:595-600.
33. Hammad, H. and B. N. Lambrecht. 2007. Lung dendritic cell migration. *Adv.Immunol.* 93:265-278.
34. Hammad, H. and B. N. Lambrecht. 2008. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat.Rev.Immunol.* 8:193-204.
35. Hayashi, T., L. Beck, C. Rossetto, X. Gong, O. Takikawa, K. Takabayashi, D. H. Broide, D. A. Carson, and E. Raz. 2004. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J.Clin.Invest.* 114:270-279.
36. Heath, W. R., G. T. Belz, G. M. Behrens, C. M. Smith, S. P. Forehan, I. A. Parish, G. M. Davey, N. S. Wilson, F. R. Carbone, and J. A. Villadangos. 2004. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol.Rev.* 199:9-26.
37. Heeg, K. and S. Zimmermann. 2000. CpG DNA as a Th1 trigger. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 121:87-97.
38. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 408:740-745.
39. Hessel, E. M., M. Chu, J. O. Lizcano, B. Chang, N. Herman, S. A. Kell, M. Wills-Karp, and R. L. Coffman. 2005. Immunostimulatory oligonucleotides block allergic airway inflammation by inhibiting Th2 cell activation and IgE-mediated cytokine induction. *J.Exp.Med.* 202:1563-1573.

40. Hintzen, G., L. Ohi, M. L. del Rio, J. I. Rodriguez-Barbosa, O. Pabst, J. R. Kocks, J. Krege, S. Hardtke, and R. Forster. 2006. Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J.Immunol.* 177:7346-7354.
41. Hirose, I., H. Tanaka, G. Takahashi, K. Wakahara, M. Tamari, T. Sakamoto, S. Kojima, N. Inagaki, and H. Nagai. 2008. Immunomodulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on house dust mite-induced airway inflammation in mice. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 147:6-16.
42. Holt, P. G., D. H. Strickland, M. E. Wikstrom, and F. L. Jahnsen. 2008. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat.Rev.Immunol.* 8:142-152.
43. Holt, P. G., J. Oliver, N. Bilyk, C. McMenamin, P. G. McMenamin, G. Kraal, and T. Thepen. 1993. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J.Exp.Med.* 177:397-407.
44. Horner, A. A., J. H. Van Uden, J. M. Zubeldia, D. Broide, and E. Raz. 2001. DNA-based immunotherapeutics for the treatment of allergic disease. *Immunol.Rev.* 179:102-118.
45. Huh, J. C., D. H. Strickland, F. L. Jahnsen, D. J. Turner, J. A. Thomas, S. Napoli, I. Tobagus, P. A. Stumbles, P. D. Sly, and P. G. Holt. 2003. Bidirectional interactions between antigen-bearing respiratory tract dendritic cells (DCs) and T cells precede the late phase reaction in experimental asthma: DC activation occurs in the airway mucosa but not in the lung parenchyma. *J.Exp.Med.* 198:19-30.
46. Iwasaki, A. and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* 5:987-995.
47. Jahn-Schmid, B., U. Wiedermann, B. Bohle, A. Repa, D. Kraft, and C. Ebner. 1999. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs modulate the allergic TH2 response of BALB/c mice to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *J.Allergy Clin.Immunol.* 104:1015-1023.
48. Jahnsen, F. L., D. H. Strickland, J. A. Thomas, I. T. Tobagus, S. Napoli, G. R. Zosky, D. J. Turner, P. D. Sly, P. A. Stumbles, and P. G. Holt. 2006. Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *J.Immunol.* 177:5861-5867.

49. Jain, V. V., K. Kitagaki, T. Businga, I. Hussain, C. George, P. O'shaughnessy, and J. N. Kline. 2002. CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 110:867-872.
50. Jain, V. V., T. R. Businga, K. Kitagaki, C. L. George, P. T. O'Shaughnessy, and J. N. Kline. 2003. Mucosal immunotherapy with CpG oligodeoxynucleotides reverses a murine model of chronic asthma induced by repeated antigen exposure. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.* 285:L1137-L1146.
51. Jakob, T., P. S. Walker, A. M. Krieg, M. C. Udey, and J. C. Vogel. 1998. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J.Immunol.* 161:3042-3049.
52. Jakubzick, C., F. Tacke, J. Llodra, N. van Rooijen, and G. J. Randolph. 2006. Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways. *J.Immunol.* 176:3578-3584.
53. Jakubzick, C., J. Helft, T. J. Kaplan and G. J. Randolph. 2008. Optimization of methods to study pulmonary dendritic cell migration reveals distinct capacities of DC subsets to acquire soluble versus particulate antigen. *J.Immunol.Methods.* 337:121-131.
54. Jiang, A., O. Bloom, S. Ono, W. Cui, J. Unternaehrer, S. Jiang, J. A. Whitney, J. Connolly, J. Banchereau, and I. Mellman. 2007. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity.* 27:610-624.
55. Julia, V., E. M. Hessel, L. Malherbe, N. Glaichenhaus, A. O'Garra, and R. L. Coffman. 2002. A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity.* 16:271-283.
56. Kabashima, K., N. Shiraishi, K. Sugita, T. Mori, A. Onoue, M. Kobayashi, J. Sakabe, R. Yoshiki, H. Tamamura, N. Fujii, K. Inaba, and Y. Tokura. 2007. CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *Am.J.Pathol.* 171:1249-1257.

57. Kim, C. H., J. H. Ahn, S. J. Kim, S. Y. Lee, Y. K. Kim, K. H. Kim, H. S. Moon, J. S. Song, S. H. Park, and S. S. Kwon. 2006. Co-administration of vaccination with DNA encoding T cell epitope on the Der p and BCG inhibited airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J.Asthma*. 43:345-353.
58. Kips, J. C., G. P. Anderson, J. J. Fredberg, U. Herz, M. D. Inman, M. Jordana, D. M. Kemeny, J. Lotvall, R. A. Pauwels, C. G. Plopper, D. Schmidt, P. J. Sterk, A. J. Van Oosterhout, B. B. Vargaftig, and K. F. Chung. 2003. Murine models of asthma. *Eur.Respir.J.* 22:374-382.
59. Kitagaki, K., T. R. Businga, and J. N. Kline. 2006. Oral administration of CpG-ODNs suppresses antigen-induced asthma in mice. *Clin.Exp.Immunol.* 143:249-259.
60. Kitagaki, K., V. V. Jain, T. R. Businga, I. Hussain, and J. N. Kline. 2002. Immunomodulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on established Th2 responses. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 9:1260-1269.
61. Kline, J. N. 2007. Eat dirt: CpG DNA and immunomodulation of asthma. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 4:283-288.
62. Kline, J. N., A. M. Krieg, T. J. Waldschmidt, Z. K. Ballas, V. Jain, and T. R. Businga. 1999. CpG oligodeoxynucleotides do not require TH1 cytokines to prevent eosinophilic airway inflammation in a murine model of asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 104:1258-1264.
63. Kline, J. N., K. Kitagaki, T. R. Businga, and V. V. Jain. 2002. Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.* 283:L170-L179.
64. Kline, J. N., T. J. Waldschmidt, T. R. Businga, J. E. Lemish, J. V. Weinstock, P. S. Thorne, and A. M. Krieg. 1998. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J.Immunol.* 160:2555-2559.
65. Klinman, D. M. 2004. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat.Rev.Immunol.* 4:249-258.
66. Klinman, D. M., A. K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover, and A. M. Krieg. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:2879-2883.

67. Kohama, Y., O. Akizuki, K. Hagihara, E. Yamada, and H. Yamamoto. 1999. Immunostimulatory oligodeoxynucleotide induces TH1 immune response and inhibition of IgE antibody production to cedar pollen allergens in mice. *J.Allergy Clin.Immunol.* 104:1231-1238.
68. Koya, T., T. Kodama, K. Takeda, N. Miyahara, E. S. Yang, C. Taube, A. Joetham, J. W. Park, A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2006. Importance of myeloid dendritic cells in persistent airway disease after repeated allergen exposure. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 173:42-55.
69. Krieg, A. M. 2007. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J.Clin.Invest.* 117:1184-1194.
70. Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, and D. M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 374:546-549.
71. Lambrecht, B. N. and H. Hammad. 2003. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat.Rev.Immunol.* 3:994-1003.
72. Lambrecht, B. N., B. Salomon, D. Klatzmann, and R. A. Pauwels. 1998. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J.Immunol.* 160:4090-4097.
73. Lambrecht, B. N., I. Carro-Muino, K. Vermaelen, and R. A. Pauwels. 1999. Allergen-induced changes in bone-marrow progenitor and airway dendritic cells in sensitized rats. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 20:1165-1174.
74. Lambrecht, B. N., M. De Veerman, A. J. Coyle, J. C. Gutierrez-Ramos, K. Thielemans, and R. A. Pauwels. 2000. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J.Clin.Invest.* 106:551-559.
75. Latz, E., A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik, and D. T. Golenbock. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat.Immunol.* 5:190-198.
76. Le, A. V. and D. H. Broide. 2006. Indoleamine-2,3-dioxygenase modulation of allergic immune responses. *Curr.Allergy Asthma Rep.* 6:27-31.

-
77. Legge, K. L. and T. J. Braciale. 2003. Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. *Immunity*. 18:265-277.
 78. McGill, J., N. van Rooijen, and K. L. Legge. 2008. Protective influenza-specific CD8 T cell responses require interactions with dendritic cells in the lungs. *J.Exp.Med.* 205:1635-1646.
 79. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 1:135-145.
 80. Mellor, A. L. and D. H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat.Rev.Immunol.* 4:762-774.
 81. Moller, G. M., S. E. Overbeek, C. G. Helden-Meeuwsen, J. M. Van Haarst, E. P. Prens, P. G. Mulder, D. S. Postma, and H. C. Hoogsteden. 1996. Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids. *Clin.Exp.Allergy.* 26:517-524.
 82. Mueller, S. N., K. A. Hosiawa-Meagher, B. T. Konieczny, B. M. Sullivan, M. F. Bachmann, R. M. Locksley, R. Ahmed, and M. Matloubian. 2007. Regulation of homeostatic chemokine expression and cell trafficking during immune responses. *Science.* 317:670-674.
 83. Muhlradt, P. F., M. Kiess, H. Meyer, R. Sussmuth, and G. Jung. 1997. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J.Exp.Med.* 185:1951-1958.
 84. O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, I. Caminschi, J. L. Miller, E. M. Anders, L. Wu, M. H. Lahoud, S. Henri, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch, and K. Shortman. 2002. Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J.Exp.Med.* 196:1307-1319.
 85. Osterholzer, J. J., T. Ames, T. Polak, J. Sonstein, B. B. Moore, S. W. Chensue, G. B. Toews, and J. L. Curtis. 2005. CCR2 and CCR6, but not endothelial selectins, mediate the accumulation of immature dendritic cells within the lungs of mice in response to particulate antigen. *J.Immunol.* 175:874-883.

86. Qu, C., E. W. Edwards, F. Tacke, V. Angeli, J. Llodra, G. Sanchez-Schmitz, A. Garin, N. S. Haque, W. Peters, N. van Rooijen, C. Sanchez-Torres, J. Bromberg, I. F. Charo, S. Jung, S. A. Lira, and G. J. Randolph. 2004. Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J.Exp.Med.* 200:1231-1241.
87. Ratzinger, G., P. Stoitzner, S. Ebner, M. B. Lutz, G. T. Layton, C. Rainer, R. M. Senior, J. M. Shipley, P. Fritsch, G. Schuler, and N. Romani. 2002. Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J.Immunol.* 168:4361-4371.
88. Robays, L. J., T. Maes, S. Lebecque, S. A. Lira, W. A. Kuziel, G. G. Brusselle, G. F. Joos, and K. V. Vermaelen. 2007. Chemokine receptor CCR2 but not CCR5 or CCR6 mediates the increase in pulmonary dendritic cells during allergic airway inflammation. *J.Immunol.* 178:5305-5311.
89. Rothenberg, M. E. and S. P. Hogan. 2006. The eosinophil. *Annu.Rev.Immunol.* 24:147-174.
90. Saeki, H., A. M. Moore, M. J. Brown, and S. T. Hwang. 1999. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J.Immunol.* 162:2472-2475.
91. Santeliz, J. V., G. Van Nest, P. Traquina, E. Larsen, and M. Wills-Karp. 2002. Amb a 1-linked CpG oligodeoxynucleotides reverse established airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 109:455-462.
92. Schnorrer, P., G. M. Behrens, N. S. Wilson, J. L. Pooley, C. M. Smith, D. El Sukkari, G. Davey, F. Kupresanin, M. Li, E. Maraskovsky, G. T. Belz, F. R. Carbone, K. Shortman, W. R. Heath, and J. A. Villadangos. 2006. The dominant role of CD8⁺ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 103:10729-10734.
93. Serebrisky, D., A. A. Teper, C. K. Huang, S. Y. Lee, T. F. Zhang, B. H. Schofield, M. Kattan, H. A. Sampson, and X. M. Li. 2000. CpG oligodeoxynucleotides can reverse Th2-associated allergic airway responses and alter the B7.1/B7.2 expression in a murine model of asthma. *J.Immunol.* 165:5906-5912.

94. Shirota, H., K. Sano, T. Kikuchi, G. Tamura, and K. Shirato. 2000. Regulation of murine airway eosinophilia and Th2 cells by antigen-conjugated CpG oligodeoxynucleotides as a novel antigen-specific immunomodulator. *J.Immunol.* 164:5575-5582.
95. Shirota, H., K. Sano, T. Kikuchi, G. Tamura, and K. Shirato. 2000. Regulation of T-helper type 2 cell and airway eosinophilia by transmucosal coadministration of antigen and oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 22:176-182.
96. Sparwasser, T., E. S. Koch, R. M. Vabulas, K. Heeg, G. B. Lipford, J. W. Ellwart, and H. Wagner. 1998. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 28:2045-2054.
97. Springer, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 76:301-314.
98. Stacey, K. J., M. J. Sweet, and D. A. Hume. 1996. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J.Immunol.* 157:2116-2122.
99. Stumbles, P. A., D. H. Strickland, C. L. Pimm, S. F. Proksch, A. M. Marsh, A. S. McWilliam, A. Bosco, I. Tobagus, J. A. Thomas, S. Napoli, A. E. Proudfoot, T. N. Wells, and P. G. Holt. 2001. Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. *J.Immunol.* 167:228-234.
100. Sun, S., X. Zhang, D. F. Tough, and J. Sprent. 1998. Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *J.Exp.Med.* 188:2335-2342.
101. Sung, S. S., S. M. Fu, C. E. Rose, Jr., F. Gaskin, S. T. Ju, and S. R. Beaty. 2006. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J.Immunol.* 176:2161-2172.
102. Sur, S., J. S. Wild, B. K. Choudhury, N. Sur, R. Alam, and D. M. Klinman. 1999. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J.Immunol.* 162:6284-6293.

103. Takabayashi, K., L. Libet, D. Chisholm, J. Zubeldia, and A. A. Horner. 2003. Intranasal immunotherapy is more effective than intradermal immunotherapy for the induction of airway allergen tolerance in Th2-sensitized mice. *J.Immunol.* 170:3898-3905.
104. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 21:335-376.
105. Takeshita, F., C. A. Leifer, I. Gursel, K. J. Ishii, S. Takeshita, M. Gursel, and D. M. Klinman. 2001. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J.Immunol.* 167:3555-3558.
106. Tang, A., M. Amagai, L. G. Granger, J. R. Stanley, and M. C. Udey. 1993. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature.* 361:82-85.
107. Taube, C., A. Dakhama, Y. H. Rha, K. Takeda, A. Joetham, J. W. Park, A. Balhorn, T. Takai, K. R. Poch, J. A. Nick, and E. W. Gelfand. 2003. Transient neutrophil infiltration after allergen challenge is dependent on specific antibodies and Fc gamma III receptors. *J.Immunol.* 170:4301-4309.
108. Tomkinson, A., G. Cieslewicz, C. Duez, K. A. Larson, J. J. Lee, and E. W. Gelfand. 2001. Temporal association between airway hyperresponsiveness and airway eosinophilia in ovalbumin-sensitized mice. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 163:721-730.
109. Trinchieri, G. and A. Sher. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat.Rev.Immunol.* 7:179-190.
110. van Rijt, L. S. and B. N. Lambrecht. 2001. Role of dendritic cells and Th2 lymphocytes in asthma: lessons from eosinophilic airway inflammation in the mouse. *Microsc.Res.Tech.* 53:256-272.
111. van Rijt, L. S., J. B. Prins, P. J. Leenen, K. Thielemans, V. C. de Vries, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2002. Allergen-induced accumulation of airway dendritic cells is supported by an increase in CD31(hi)Ly-6C(neg) bone marrow precursors in a mouse model of asthma. *Blood.* 100:3663-3671.
112. van Rijt, L. S., S. Jung, A. KleinJan, N. Vos, M. Willart, C. Duez, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2005. In vivo depletion of lung CD11c⁺ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J.Exp.Med.* 201:981-991.

113. Vermaelen, K. and R. Pauwels. 2003. Accelerated airway dendritic cell maturation, trafficking, and elimination in a mouse model of asthma. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 29:405-409.
114. Vermaelen, K. and R. Pauwels. 2004. Accurate and simple discrimination of mouse pulmonary dendritic cell and macrophage populations by flow cytometry: methodology and new insights. *Cytometry A.* 61:170-177.
115. Vermaelen, K. Y., D. Cataldo, K. Tournoy, T. Maes, A. Dhulst, R. Louis, J. M. Foidart, A. Noel, and R. Pauwels. 2003. Matrix metalloproteinase-9-mediated dendritic cell recruitment into the airways is a critical step in a mouse model of asthma. *J.Immunol.* 171:1016-1022.
116. Vermaelen, K. Y., I. Carro-Muino, B. N. Lambrecht, and R. A. Pauwels. 2001. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J.Exp.Med.* 193:51-60.
117. Villadangos, J. A. and P. Schnorrer. 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat.Rev.Immunol.* 7:543-555.
118. von Garnier, C., L. Filgueira, M. Wikstrom, M. Smith, J. A. Thomas, D. H. Strickland, P. G. Holt, and P. A. Stumbles. 2005. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J.Immunol.* 175:1609-1618.
119. Vremec, D., J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu, and K. Shortman. 2000. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J.Immunol.* 164:2978-2986.
120. Wagner, H. 2002. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr.Opin.Microbiol.* 5:62-69.
121. Weigt, H., C. Nassenstein, T. Tschernig, P. F. Muhlradt, N. Krug, and A. Braun. 2005. Efficacy of macrophage-activating lipopeptide-2 combined with interferon-gamma in a murine asthma model. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 172:566-572.
122. Wendland, M., N. Czeloth, N. Mach, B. Malissen, E. Kremmer, O. Pabst, and R. Forster. 2007. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104:6347-6352.

123. Wikstrom, M. E. and P. A. Stumbles. 2007. Mouse respiratory tract dendritic cell subsets and the immunological fate of inhaled antigens. *Immunol.Cell Biol.* 85:182-188.
124. Wild, J. S. and S. Sur. 2001. CpG oligonucleotide modulation of allergic inflammation. *Allergy.* 56:365-376.
125. Wills-Karp, M. and C. L. Karp. 2004. Biomedicine. Eosinophils in asthma: remodeling a tangled tale. *Science.* 305:1726-1729.
126. Wills-Karp, M., J. Santeliz, and C. L. Karp. 2001. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat.Rev.Immunol.* 1:69-75.
127. Wilson, N. S. and J. A. Villadangos. 2005. Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Adv.Immunol.* 86:241-305.
128. Wilson, N. S., G. M. Behrens, R. J. Lundie, C. M. Smith, J. Waithman, L. Young, S. P. Forehan, A. Mount, R. J. Steptoe, K. D. Shortman, T. F. Koning-Ward, G. T. Belz, F. R. Carbone, B. S. Crabb, W. R. Heath, and J. A. Villadangos. 2006. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat.Immunol.* 7:165-172.
129. Yanagihara, S., E. Komura, J. Nagafune, H. Watarai, and Y. Yamaguchi. 1998. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J.Immunol.* 161:3096-3102.
130. Yi, A. K., R. Tuetken, T. Redford, M. Waldschmidt, J. Kirsch, and A. M. Krieg. 1998. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J.Immunol.* 160:4755-4761.
131. Youn, C. J., M. Miller, K. J. Baek, J. W. Han, J. Nayar, S. Y. Lee, K. McElwain, S. McElwain, E. Raz, and D. H. Broide. 2004. Immunostimulatory DNA reverses established allergen-induced airway remodeling. *J.Immunol.* 173:7556-7564.
132. Young, L. J., N. S. Wilson, P. Schnorrer, A. Mount, R. J. Lundie, N. L. La Gruta, B. S. Crabb, G. T. Belz, W. R. Heath, and J. A. Villadangos. 2007. Dendritic cell preactivation impairs MHC class II presentation of vaccines and endogenous viral antigens. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104:17753-17758.

6. Abkürzungsverzeichnis

Alum	Aluminiumhydroxid
AP-1	Aktivatorprotein 1
APC	antigenpräsentierende Zellen (<i>engl.: antigen presenting cells</i>)
APC	Allophycocyanin
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALB/c	Mausstamm
BHR	bronchiale Hyperreaktivität
BL6	C57BL/6, Mausstamm
BM	Knochenmark (<i>engl.: bone marrow</i>)
BSA	bovines Serumalbumin
BSS	<i>engl.: Balanced Salt Solution</i>
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	Differenzierungsmarker (<i>engl.: cluster of differentiation</i>)
cDC	konventionelle dendritische Zellen (<i>engl.: conventional dendritic cells</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>engl.: complementary DNA</i>)
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
CLIP	<i>engl.: class II-associated invariant chain peptide</i>
CpG	CpG-ODN 1668
CpG-ODN	CpG-Motive enthaltende synthetische Oligonukleotide
CTL	cytotoxische T-Zellen (<i>engl.: cytotoxic T lymphocytes</i>)
CXCL	CXC-Chemokin-Ligand
DC	dendritische Zellen (<i>engl.: dendritic cells</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
DO11.10	OVA ₃₂₃₋₃₃₉ -spezifische CD4 ⁺ T-Zellen auf BALB/c-Hintergrund,
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunnachweis (<i>engl.: enzyme-linked immunoassay</i>)
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie (<i>engl.: fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>engl.: fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLT3L	<i>engl.: FMS-related tyrosin kinase 3 ligand</i>

GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>engl.: Granulocyte Macrophage colony stimulating factor</i>)
HEV	postkapillare Venen (<i>engl.: high endothelial venules</i>)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	<i>engl.: intercellular adhesion molecule</i>
IDO	Indolamin-2,3-desoxygenase
IFN	Interferon
IgE	Immunglobulin E
IKK	NF κ B -Inhibitor-Komplex
IL	Interleukin
IMDM	<i>engl.: Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
KO-Maus	für ein bestimmtes Gen defiziente (<i>engl.: knockout</i>) – Maus
LC	Langerhanszellen (<i>engl.: Langerhans cells</i>)
LFA	<i>engl.: Leukocyte function-associated antigen-1</i>
LK	Lymphknoten
Mac-1	Makrophagen-Antigen-1
MAdCAM	<i>engl.: Mucosal addressin cell adhesion molecule</i>
MALP-2	Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid-2
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
mDC	myeloide dendritische Zellen (<i>engl. myeloid dendritic cells</i>)
MEM	Minimalmedium (<i>engl.: Minimum essential medium</i>)
MFI	durchschnittliche Fluoreszenzintensität (<i>engl.: mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Molekül des Haupthistokompatibilitätskomplexes (<i>engl.: major histocompatibility complex</i>)
MMP	Matrixmetallprotease
mRNA	Messenger-RNA
M-trp	1-Methyl-DL-Tryptophan
MyD88	<i>engl.: Myeloid Differentiation Primary-Response Protein 88</i>
NFκB	Nuklearfaktor κ B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne
OT-I	OVA ₃₅₇₋₃₆₄ -spezifische CD8 ⁺ T-Zellen auf BL6-Hintergrund

OT-II	OVA ₃₂₃₋₃₃₉ -spezifische CD4 ⁺ T-Zellen auf BL6-Hintergrund
OVA	Ovalbumin
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>engl.: pathogen-associated molecular pattern</i>)
PE	Phycoerythrin
PBS	Phosphat-Puffer (<i>engl.: phosphate buffered saline</i>)
PD-1	<i>engl.: programmed death 1</i>
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen (<i>engl.: plasmacytoid dendritic cells</i>)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
<i>plt/plt</i>	<i>engl.: paucity of lymph-node T cells</i> – Mäuse
PRR	Mustererkennungsmolekül (<i>engl.: pattern recognition receptor</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.: ribonucleic acid</i>)
RPMI	<i>engl.: Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT-PCR	in Echtzeit durchgeführte Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.: real-time polymerase chain reaction</i>)
SEM	Standardfehler (<i>engl.: standard error of the mean</i>)
TAP	<i>engl.: transporter associated with antigen presentation</i>
TCR	T-Zell-Antigenrezeptor (<i>engl.: T-cell receptor</i>)
TGFβ	Transforming growth factor-β
Th	T-Helferzelle
TIMP	Gewebisinhibitor der Metallprotease
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptordomäne
TIRAP	TIR-Domäne enthaltende Adaptorproteine
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>engl.: toll like receptor</i>)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF6	TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6
TRAM	TRIF-verwandte Adaptormoleküle
TRIF	TIR-Domäne enthaltende Interferon-β induzierende Adaptorproteine
VCAM	<i>engl.: vascular cell adhesion molecule</i>
VLA	<i>engl.: Very late antigen</i>
wt	Wildtyp

Maßeinheiten:

cm²	Quadratzentimeter
cm³	Kubikzentimeter
g	Gramm

g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
l	Liter
M	Mol, molar
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	millimolar
mOsm	Milliosmol
ng	Nanogramm
nmol	nanomolar
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.: rotations per minute</i>)
s	Sekunde
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>engl.: unit</i>)

7. Anhang

7.1 Danksagung

Zunächst bedanke ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Georg M.N. Behrens für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, das Nahebringen immunologischen und wissenschaftlichen Denkens, die vertrauensvolle und offene Arbeitssphäre sowie seine anspornende optimistische Sichtweise.

Prof. Dr. Walter Müller danke ich für die Übernahme der Referenz sowie seine Hilfe und Beratung bei all meinen Fragen um die Dissertation.

Ich bedanke mich bei meinen Kollegen aus der AG Behrens, Marion Hitzgrath, Prajeeth CK, Adan C. Jirmo, Mannan A. Baru, Kumar J. Krishnaswamy und Metodi V. Stankov, für das sehr gute Klima sowohl bei der Arbeit im Labor als auch in unserem gemütlichen Büro- und Aufenthaltsraum. Vielen Dank für die praktische Unterstützung bei Mäusen und Experimenten, genauso wie für die Gespräche und Diskussionen nicht nur über Ergebnisse und fachliche Themen. Speziell danke ich noch mal Metodi für seinen Einsatz bei der RT-PCR.

Weithin danke ich den Mitarbeitern der Abteilung Klinische Immunologie mit Ihrem Leiter Prof. Dr. Reinhold E. Schmidt für die labortechnische und methodische Unterstützung, die angenehme Atmosphäre bei den Freitagseminaren und die netten Betriebsveranstaltungen.

Den Kollegen aus der Funktionellen Anatomie 2, Prof. Dr. Thomas Tschernig und Christina Hartwig, danke ich für die Einarbeitung in die Asthmathematik und die Hilfe bei den klassischen Mausmodellen. Ebenso bedanke ich mich bei Karin Westermann und Damaris Leenhuis für die Anfertigung der histologischen Präparate.

Christina Reimer und Matthias Ballmeier danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Zellsortierung.

Ein großer Dank geht auch an meine Schwester mit Familie sowie alle Freunde, die mir, vor allem in der Endphase der Promotion, immer wieder mit viel Verständnis zugehört, mich unterstützt und motiviert haben.

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Hannelore-Susanne Constabel
Geburtsdatum: 30.08.1968
Geburtsort: Haldensleben (Sachsen-Anhalt)

Ausbildung

2005 - bis dato Promotionsstudentin an der Leibniz Universität Hannover
1999 – 2005 Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Carolo Wilhelmina in Braunschweig, Abschluss Diplom
1996 – 1999 Abitur auf dem zweiten Bildungsweg an der Franz-Auweck-Abendschule in München, Abitur am bayerischen Kultusministerium in München
1985 – 1988 Berufsausbildung als MTA-Labor an der Medizinischen Fachschule der Medizinischen Akademie Magdeburg
1975 – 1985 Allgemeinbildende Zehnklassige Polytechnische Oberschule Karl Liebknecht in Haldensleben

Berufserfahrung

2005 – 2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abt. Klinische Immunologie, im Rahmen des SFB 587
1993 – 1999 MTA im Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern in München
1988 – 1993 MTA im Zentrallabor des Kreiskrankenhauses Haldensleben

7.3 Publikationsverzeichnis

Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften

Constabel, H., M. V. Stankov, C. Hartwig, T. Tschernig and G. M. N. Behrens. 2009. Impaired lung dendritic cell migration and T cell stimulation induced by immunostimulatory oligonucleotides contribute to reduced allergic airway inflammation. *J. Immunol.* 183: 3443-3453

Hartwig, C., M. Mazzega, **H. Constabel**, J. E. Gessner, A. Braun, T. Tschernig and G. M. N. Behrens. Fc γ receptor mediated antigen uptake by lung dendritic cells contributes to allergic airway hyper-responsiveness and inflammation. *Eur. J. Immunol.* (in Revision)

Hartwig, C., **H. Constabel**, D. Neumann, H. G. Hoymann, T. Tschernig and G. M. N. Behrens. 2008. Impact of boosting for the strength of asthma parameters and dendritic cell numbers in a C57BL/6 model of allergic airway inflammation. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 60: 425-434

Poster

Constabel, H., C. Hartwig, T. Tschernig and G. M. N. Behrens. Impact of CpG on dendritic cell function for preventing allergic asthma.

10. Internationales Symposium über dendritische Zellen, 2008, in Kobe, Japan

Vortrag

Constabel, H., C. Hartwig, T. Tschernig and G. M. N. Behrens. Der Einfluss von Toll-like Rezeptorliganden auf die adaptive Immunantwort in einem murinen Asthmodell.

Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, 2006, in Mainz

7.4 Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Einfluss von CpG auf die Funktion dendritischer Zellen im Rahmen pulmonaler Entzündungsreaktionen im Mausmodell“ selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder eine andere Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 18.11.2009

Hannelore Constabel