Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

# Immunstimulatorische DNA: Wirkung auf Effektorlymphozyten des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Veit Hornung

aus München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

| | |
|---|---|
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. med. S. Endres |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. Th. Brocker |
| Mitberichterstatter: | Prof. Dr. M.-C. Jung |
| | Prof. Dr. R. A. W. Rupp |
| Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter: | PD Dr. med. G. Hartmann |
| | Dr. med. S. Rothenfußer |
| Dekan: | Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 08.07.2004 |

Meinen Eltern in Dankbarkeit

# Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG ..... 2
1.1. Das humane Immunsystem ..... 2
1.1.1. Die zwei Komponenten des humanen Immunsystems ..... 2
1.1.2. Angeborene und adaptive Immunität bedienen sich unterschiedlicher Erkennungsstrategien ..... 3
1.1.3. *Pattern-recognition*-Rezeptoren als Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität ..... 4
1.1.3.1. Die Familie der *Toll*-Rezeptoren ..... 5
1.1.3.2. Vom *Toll*-Rezeptor der Drosophila zu den *Toll-like*-Rezeptoren des Menschen ..... 5
1.1.3.3. Die humanen *Toll-like*-Rezeptoren und ihre Liganden ..... 6
1.1.3.4. Signaltransduktion durch *Toll-like*-Rezeptoren ..... 7
1.2. Effektormechanismen der angeborenen Immunität ..... 10
1.2.1. Interferone ..... 10
1.2.2. Natürliche Killerzellen ..... 10
1.2.3. $\gamma\delta$ T-Zellen ..... 12
1.3. Dendritische Zellen - Mittler zwischen angeborener und adaptiver Immunität ..... 15
1.3.1. Die plasmazytoide dendritische Zelle ..... 17
1.3.1.1. Die Entdeckung der T-assoziierten „Plasmazellen“ ..... 17
1.3.1.2. Die plasmazytoide dendritische Zelle ..... 18
1.3.1.3. Die natürliche Typ-I-Interferon-produzierende Zelle ..... 19
1.3.2. Die myeloide dendritische Zelle ..... 19
1.4. Zelluläre Bestandteile der adaptiven Immunität ..... 20
1.4.1. $\alpha\beta$ T-Zellen ..... 20
1.5. CpG-Oligodesoxynukleotide als Adjuvanzien in der Immuntherapie ..... 21
1.5.1. Von bakteriellen Lysaten zu CpG-Oligodesoxynukleotiden ..... 21
1.5.2. Die Erkennung von CpG-Motiven als Abwehrmechanismus ..... 23
1.5.3. Wirkung auf das Immunsystem ..... 24
1.5.4. Wirkung von CpG-DNA auf zellulärer Ebene ..... 24
1.5.4.1. B-Zellen ..... 24
1.5.4.2. Dendritische Zellen ..... 25
1.5.4.3. NK-Zellen und T-Zellen ..... 26
1.5.5. Wirkung von CpG-DNA auf subzellulärer Ebene ..... 26
1.5.6. CpG-Oligodesoxynukleotide im therapeutischen Einsatz ..... 27
1.5.6.1. Übertragung auf das Immunsystem des Menschen ..... 28

1.5.6.2. Die Existenz zweier verschiedener CpG-Klassen ..... 28
1.5.6.3. Untersuchungen an Primaten ..... 29
1.5.6.4. CpG-DNA in der Immuntherapie von Tumoren ..... 30
1.6. Fragestellung ..... 32

2. MATERIAL UND METHODEN ..... 34
2.1. Reagenzien, Chemikalien und Geräte ..... 34
2.1.1. Geräte ..... 34
2.1.2. Chemikalien ..... 34
2.1.3. Radioaktive Chemikalien ..... 35
2.1.4. Reagenziensätze ..... 35
2.1.6. Materialien für die Zellkultur ..... 35
2.1.7. Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzien ..... 36
2.1.8. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen ..... 36
2.1.9. Antikörper und tetramere MHC-I-Komplexe ..... 38
2.1.10. Oligodesoxynukleotide ..... 39
2.1.11. Peptide ..... 39
2.1.12. *Primer* für die real-time-PCR ..... 39
2.1.13. Zelllinien ..... 40
2.2. Zellulär-immunologische Methoden ..... 40
2.2.1. Zellkultur ..... 40
2.2.1.1. Allgemeine Kulturbedingungen ..... 40
2.2.1.2. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität ..... 40
2.2.1.3. Bestrahlung von Stimulatorzellen ..... 41
2.2.1.4. Kultivierung von Tumorzelllinien ..... 41
2.2.1.5. Kultivierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes ..... 41
2.2.2. Durchflusszytometrie ..... 42
2.2.2.1. Allgemeines Funktionsprinzip ..... 42
2.2.2.2. Bestimmung von Oberflächenmolekülen ..... 43
2.2.2.3. Bestimmung von intrazellulären Molekülen ..... 43
2.2.2.4. Proliferationsmessung mittels Durchflusszytometrie ..... 44
2.2.2.5. Tetramere MHC-I-Moleküle ..... 44
2.2.3. Aufreinigung von Zellpopulationen ..... 45
2.2.3.1. Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes ..... 45
2.2.3.2. Aufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung ..... 46

2.2.3.3. Aufreinigung mit der FACS-Technologie ..... 46
2.2.4. *Enzyme-linked immunosorbent assay* ..... 47
2.2.5. Zellvermittelter Zytotoxizitätstest ($^{51}$Chrom-Lyse-Test) ..... 47
2.3. Molekularbiologische Methoden ..... 48
2.3.1. Extraktion zytoplasmatischer RNA ..... 48
2.3.2. Gelelektrophorese ..... 49
2.3.3. Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Oligonukletoiden ..... 49
2.3.4. Reverse Transkription ..... 49
2.3.5. Polymerase-Kettenreaktion ..... 50
2.3.5.1. Allgemeines Funktionsprinzip ..... 50
2.3.5.2. *Hot-start*-Verfahren ..... 51
2.3.5.3. *Touch-down*-Verfahren ..... 51
2.3.5.4. *Real-time*-PCR ..... 52
2.4. Statistische Analyse ..... 53

3. ERGEBNISSE ..... 54
3.1. Identifizierung von CpG-reaktiven lymphozytären Zellpopulationen durch Untersuchung der differenziellen TLR-Expression ..... 54
3.1.1. Charakterisierung der Expression von TLR1-10 in PDCs, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen ..... 54
3.1.2. Vergleich des TLR-Expressionmusters mit direkter CpG-ODN-Sensitivität ..... 57
3.1.3. Modulation der TLR7- und TLR9-Expression in B-Zellen und PDCs nach Stimulation mit CpG-DNA ..... 58
3.2. Wirkung von CpG-DNA als Adjuvans in der Aktivierung von T-Zellen und NK-Zellen *in vitro* ..... 60
3.2.1. CpG-Oligodesoxynukleotide steigern IFN Typ I-abhängig die Immunantwort von γδ T-Zellen und NK-Zellen ..... 60
3.2.1.1. γδ T-Zellen und NK-Zellen werden durch CpG-Stimulation innerhalb von PBMCs aktiviert ..... 61
3.2.1.2. CpG-ODNs kostimulieren eine Antigen-induzierte Aktivierung von γδ T-Zellen und NK-Zellen innerhalb von PBMCs ..... 62
3.2.1.3. γδ T-Zellen und NK-Zellen sind die IFN-γ-Produzenten innerhalb von PBMCs nach CpG-ODN-Stimulation ..... 64

3.2.1.4. CpG-ODNs steigern synergistisch die Proliferation IPP-stimulierter γδ T-Zellen ..... 66
3.2.1.5. CpG-ODNs induzieren die Perforin-Produktion in γδ T-Zellen und NK-Zellen und erhöhen ihre lytische Aktivität ..... 68
3.2.1.6. γδ T-Zellen werden indirekt durch CpG-induzierte Zytokine aktiviert ..... 70
3.2.1.7. Die CpG-vermittelte Aktivierung von γδ T-Zellen lässt sich durch IFN Typ I nachahmen ..... 72
3.2.2.8. Die Hemmung von IFN Typ I verhindert die synergistische Steigerung der γδ T-Zell-Aktivierung durch CpG-ODN ..... 74
3.2.3. CpG-ODNs steigern synergistisch die Immunantwort von Antigen-stimulierten αβ T-Zellen ..... 76
3.2.3.2. Etablierung eines Modells zur Untersuchung einer Peptid-spezifischen αβ T-Zell-Immunantwort ..... 78
3.2.3.3. Beide CpG-ODN-Klassen steigern die Frequenz Antigen-spezifischer T-Zellen nach Stimulation mit einem *recall*-Antigen ..... 79
3.2.3.4. Nur ODN 2006 steigert die Frequenz Antigen-spezifischer T-Zellen nach Stimulation mit einem Naiv-Antigen ..... 82
3.2.3.5. In Anwesenheit von CpG-ODNs generierte T-Zellen exprimieren einen zytotoxischen, enddifferenzierten Phänotyp ..... 84
3.2.3.5. Die durch CpG-ODNs gesteigerte Frequenz spezifischer T-Zellen korreliert mit einer erhöhten Zytotoxizität ..... 87

4. DISKUSSION ..... 88
4.1. Übersicht über die experimentellen Befunde ..... 88
4.2. Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur ..... 89
4.2.1. Differenzielle TLR-Expression in Zellpopulationen des peripheren Blutes ..... 89
4.2.1.1. TLR9-Expression korreliert mit direkter Sensitivität auf CpG-DNA ..... 90
4.2.1.2. Vergleich des Expressionsmusters von TLRs in humanen Lymphozytensubpopulationen ..... 91
4.2.1.3. Differenzielle TLR-Expression auf dendritischen Zellen ..... 92
4.2.1.4. TLR-Expression auf NK-Zellen und T-Zellen ..... 93
4.2.2. Erklärungsmodelle für die unterschiedliche Reaktionsweise verschiedener Antigen-präsentierender Zellen auf korrespondierende TLR-Liganden ..... 94
4.2.2.1. Das Stimulus- und das *lineage*-Modell ..... 94
4.2.2.2. Modulation der Immunantwort auf Ebene der TLR-Adapterproteine ..... 95

4.2.3. Einfluss methodischer Aspekte auf CpG-Stimulationsexperimente ..... 96
4.2.4. CpG-DNA aktiviert indirekt Effektorzellen der angeborenen Immunität ..... 98
4.2.4.1. Rolle der γδ T-Zelle in der CpG-vermittelten Antitumorwirkung ..... 98
4.2.4.2. IFN Typ I aktiviert γδ T-Zellen ..... 99
4.2.4.3. CpG-A stimuliert Effektorzellen via Interferon Typ I ..... 100
4.2.5. Mögliche Mechanismen der unterschiedlichen Wirkprofile im Hinblick auf die Induktion einer adaptiven Immunantwort ..... 101
4.2.5.1. Welche Antigen-präsentierende Zelle stimuliert die T-Zellen? ..... 101
4.2.5.2. Interferon inhibiert das Priming naiver T-Zellen ..... 102
4.2.6. Zwei verschiedene CpG-Klassen – charakterisiert durch ihre primären Zielzellen ..... 104
4.2.6.1. Nur CpG-B stimuliert die B-Zelle ..... 104
4.2.6.2. CpG-A und CpG-B induzieren eine qualitativ unterschiedliche Antwort der PDC ..... 105
4.2.6.3. Strukturelle Unterschiede der beiden CpG-Klassen ..... 105
4.2.6.4. Differenzielle Aufnahme als Ursache der beiden CpG-Klassen? ..... 106
4.2.6.5. Scavengerrezeptor-A als Bindungspartner von CpG-A? ..... 107
4.2.6.6. Formierung unterschiedlicher Rezeptorkomplexe ..... 108
4.2.6.7. Partikuläre CpG-Strukturen könnten ein *clustering* von TLR9 induzieren ..... 108
4.2.6.8. Kooperieren andere Rezeptoren mit TLR9? ..... 109
4.3. Klinische Relevanz der Ergebnisse ..... 110
4.3.1. Von Maus zu Mensch ..... 110
4.3.2. Klinische Bedeutung der unterschiedlichen CpG-Klassen ..... 111

5. ZUSAMMENFASSUNG ..... 114

6. LITERATURVERZEICHNIS ..... 118

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme ..... 134

Danksagung ..... 136

Veröffentlichungen ..... 137

Lebenslauf ..... 139

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Das humane Immunsystem

Jeder Mensch ist der ständigen Gefahr ausgesetzt, durch Mikroorganismen aus seiner Umwelt oder pathologisch transformierte eigene Zellen in seiner Unversehrtheit gestört zu werden. Die Hauptaufgabe der Zellen und Mechanismen, die unter dem Begriff Immunsystem zusammengefasst sind, ist es, gegen diese Bedrohung die individuelle Integrität des Organismus aufrechtzuerhalten. Das Immunsystem muss dabei in den Körper eindringende, fremde Substanzen und Zellen erkennen und ausschalten, ohne die körpereigenen, gesunden Strukturen anzugreifen. Die Unterscheidung von normalem "Selbst" und "Fremd", worunter auch pathologisch veränderte eigene Zellen, wie Tumorzellen und Virus-infizierte Zellen, verstanden werden, ist eine der faszinierendsten und wichtigsten Fähigkeiten des Immunsystems.

### *1.1.1. Die zwei Komponenten des humanen Immunsystems*

Das Immunsystem wird traditionell in zwei Komponenten eingeteilt – die angeborene und die adaptive Immunität. Das adaptive Immunsystem wird durch zwei Klassen spezialisierter Zellen vertreten, den B- und T-Lymphozyten. Das Repertoire an Antigenerkennungsmechanismen in der Gesamtheit dieser Zellpopulation ist sehr groß, da durch den Prozess der somatischen Rekombination jeder Lymphozyt mit einem strukturell einzigartigen Antigenrezeptor ausgestattet wird. Die Größe und auch Mannigfaltigkeit dieses Rezeptor-Repertoires erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass für ein spezifisches Antigen ein „passender“ Lymphozyt existiert, der auf Erkennung seines Antigens mit Aktivierung, Proliferation und entsprechender Effektorfunktion antwortet. Dieser Prozess der Vermehrung und Differenzierung eines Lymphozyten nach seiner spezifischen Antigenerkennung, der klonale Selektion genannt wird, stellt das Herzstück der adaptiven Immunabwehr dar. Eine klonale Expansion der Lymphozyten auf Antigenstimulation ist zum Beispiel im Rahmen einer viralen Infektion absolut notwendig um eine effiziente Immunantwort zu generieren. Es dauert jedoch drei bis fünf Tage bis eine ausreichende Zahl an klonal expandierten Lymphozyten erreicht ist und diese in Effektorzellen umgewandelt sind. Diese Lücke füllt das angeborene Immunsystem, das in der Lage ist, in dieser frühen Phase einer Infektion Mikroben zu erkennen und effektiv zu bekämpfen. Durch die Mechanismen der

angeborenen Immunität wie Phagozytose, Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Antigenpräsentation wird zudem die Aktivierung der adaptiven Immunität eingeleitet, und dabei die spezifische Immunantwort den Bedürfnissen der Abwehrsituation entsprechend modifiziert. Die beiden Mechanismen sind somit als Bestandteile eines gemeinsamen Abwehr-Konzepts zu verstehen, in dem die angeborene Immunität Sensor- und Aktivatorfunktion für die folgende spezifische Immunantwort übernimmt.

### *1.1.2. Angeborene und adaptive Immunität bedienen sich unterschiedlicher Erkennungsstrategien*

Ein Hauptunterschied zwischen angeborener und adaptiver Immunität liegt in den Mechanismen, die sie verwenden, um Fremd von Eigen zu unterscheiden. Das adaptive Immunsystem bedient sich der T- und B-Zell-Rezeptoren, welche somatisch während der Lymphozytenreifung durch Rekombination der Rezeptor-kodierenden Gene so angelegt werden, dass jeder Lymphozyt mit einem strukturell einzigartigen Rezeptor ausgestattet wird. Da diese Rezeptoren nicht in der Keimbahn kodiert werden, sind sie nicht prädestiniert, ein bestimmtes Antigen zu erkennen. Aus dem zufällig generierten Rezeptorrepertoire werden im Laufe des Lebens lediglich die „nützlichen“ Rezeptoren durch positive und negative Selektionsmechanismen ausgewählt, die ihr spezifisches Antigen erkennen und die dazugehörigen Lymphozyten werden klonal expandiert. Obwohl diese Rezeptoren theoretisch für jeden Organismus einen Selektionsvorteil darstellen, müssen sie von jeder Generation „neu erfunden“ werden, da sie in der Keimbahn nicht weitergegeben werden können.

Im Laufe der Evolution hat sich die angeborene Immunität lange vor der adaptiven Immunität herausgebildet. So verfügt jedes mehrzellige Lebewesen über irgendeine Form der angeborenen Immunität. Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem werden die Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität durch Keimbahn-kodierte Rezeptoren vermittelt. Die Spezifität eines jeden Rezeptors ist daher genetisch determiniert. Dies ist in sofern von Vorteil, als sich diese Rezeptoren, die sich unter dem Selektionsdruck der Evolution zu Mikroorganismen-spezifischen Rezeptoren herausgebildet haben, von Generation zu Generation weitergegeben werden können. Der Nachteil besteht jedoch darin, dass jedes Genom in Größe und somit in Anzahl kodierender Gene limitiert ist. So vermutet man, dass lediglich ca. 0,1 bis 1 Prozent der 60.000 bis 75.000 kodierenden Gene des menschlichen Genoms mit dem

Immunsystem in Verbindung zu bringen sind. Im Vergleich dazu werden im Laufe des Lebens durch den Prozess der somatischen Rekombination ca. $10^{14}$ bis $10^{18}$ verschiedene T-Zellrezeptoren (TZR) und Immunglobuline (Ig) generiert.

Um dem Ungleichgewicht zwischen der großen Zahl heterogener und einem ständigen Selektionsdruck unterliegenden Mikroorganismen auf der einen Seite, und der begrenzten Kapazität an Erkennungsmechanismen auf der anderen Seite gerecht zu werden, haben sich die sogenannten *pattern-recognition*-Rezeptoren (PRRs) herausgebildet. Diese Rezeptoren erkennen einige hoch-konservierte Strukturen, die vielen Mikroorganismen gemeinsam sind, die sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Diese molekularen Erkennungsmuster stellen zwar strukturell eine sehr heterogene Gruppe dar, teilen jedoch einige gemeinsame Eigenschaften:

(1) PAMP*s* sind spezifisch für mikrobielle Pathogene und kommen im Wirtsorganismus nicht vor.

(2) Die durch das angeborene Immunsystem erkannten Strukturen sind essenziell für den Überlebensvorteil des Pathogens und können daher trotz Selektionsdruck des Wirts nicht mutieren.

(3) Bei den erkannten Strukturen handelt es sich in der Regel um invariante Strukturen, die von einer großen Klasse von pathogenen Keimen geteilt werden.

### *1.1.3. Pattern-recognition-Rezeptoren als Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität*

Die in der Keimbahn festgelegten Rezeptoren der angeborenen Immunität unterscheiden sich von den Antigen-Rezeptoren der adaptiven Immunität in mehreren entscheidenden Punkten. Die PRRs werden von vielen verschiedenen Effektorzellen der angeborenen Immunität exprimiert, insbesondere den Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen (DC) und B-Zellen. Das Expressionsmuster ist, wie oben aufgeführt, jedoch nicht klonal verteilt, sondern alle Zellen einer bestimmten Subpopulation exprimieren Rezeptoren einer identischen Spezifität. Überdies ist die auf Rezeptorstimulation folgende Antwort der jeweiligen Zelle, im Gegensatz zur verzögerten Proliferationsantwort der adaptiven Immunzelle, durch eine unmittelbare Reaktion gekennzeichnet. Wie man heute weiß, erfüllen unter anderem Mitglieder der Familie der Lektin-Rezeptoren [Banchereau, 2000], der

Scavenger-Rezeptoren [Peiser, 2002] als auch der *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) [Barton, 2002a] die Kriterien oben beschriebener PRRs.

#### 1.1.3.1. Die Familie der *Toll*-Rezeptoren

Charles Janeway postulierte bereits 1992 [Janeway 1992] die Existenz dieser PRRs, dem Herzstück der angeborenen Immunität. Neben der Initiation der raschen Komponente der angeborenen Immunantwort, schrieb er diesen Rezeptoren auch eine entscheidende Rolle in der Induktion einer adaptiven Immunantwort zu.

Die Entdeckung der Struktur und Rolle des *Toll*-Rezeptors in der angeborenen Immunität der Drosophila [Lemaitre, 1996; Williams, 1997] und die Identifikation eines *Toll*-Rezeptor-Homologs als verantwortliches Gen für LPS-Sensitivität in zwei natürlichen Maus-Mutanten [Poltorak, 1998; Hoshino, 1999; Qureshi, 1999] brachten erste experimentelle Bestätigung der Existenz solcher Erkennungsmechanismen.

#### 1.1.3.2. Vom *Toll*-Rezeptor der Drosophila zu den *Toll-like*-Rezeptoren des Menschen

*Toll*-Rezeptoren sind evolutionär hoch-konservierte Transmembranproteine des Typ I [Anderson 2000], deren Funktion zuerst im Zusammenhang mit der dorsoventralen Ausrichtung in der Embryonalentwicklung der Drosophila beschrieben wurde [Hashimoto, 1988; Belvin, 1996]. Durch Zufall wurde bald darauf eine bedeutende Rolle dieses Rezeptors in der Abwehr von Pilzinfektionen der Drosophila entdeckt [Lemaitre, 1996]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein *Toll*-verwandtes Protein namens *18-wheeler* eine bedeutende Funktion in der anti-bakteriellen Abwehr der Fruchtfliege einnimmt [Williams, 1997]. Bei der Durchsicht von humanen Gendatenbanken wurde kurz darauf eine dem Drosophila-*Toll*-Gen verwandte Sequenz im menschlichen Genom identifiziert, welche später humaner TLR1 getauft wurde [Nomura, 1994; Taguchi, 1996]. Auf ihrer Suche nach Erkennungsstrukturen des angeborenen, humanen Immunsystems identifizierten Janeway und Mitarbeiter das erste strukturhomologe Protein des Drosophila-Toll im humanen System - hTLR4 [Medzhitov, 1997b]. Erste funktionelle Untersuchungen bestätigten die Bedeutung dieser Proteinklasse auch für das angeborene Immunsystem des Menschen. So führte die Überexpression dieses Proteins in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors NF-κB zu der Produktion von proinflammatorischen Mediatoren. Ferner wurde auch die

postulierte Rolle in der Induktion einer adaptiven Immunität bekräftigt, da Zelllinien, die dieses Protein stark exprimierten, zur Aktivierung von naiven T-Zellen führten.

Den eindeutigen Beweis, der TLR4 als einen PRR des angeborenen Immunsystems schlechthin klassifizierte, brachte die Beobachtung, dass TLR4 dem LPS-Signalkomplex in der Maus angehört. Poltorak et al. konnten als erste zeigen, dass Mäuse mit spontaner Mutation des TLR4-Gens nicht auf LPS-Stimulation reagierten und somit eine sonst tödliche Endotoxin-Gabe schadlos überstanden [Poltorak, 1998]. Diese Beobachtung wurde später an TLR4-*Knock-out*-Mäusen durch andere Arbeitsgruppen bestätigt [Hoshino, 1999; Qureshi, 1999].

#### 1.1.3.3. Die humanen *Toll-like*-Rezeptoren und ihre Liganden

Mittlerweile sind zehn humane TLRs beschrieben und es ist davon auszugehen, dass weitere Vertreter dieser Proteinfamilie im Laufe der Vervollständigung der humanen Gendatenbanken identifiziert werden [Rock, 1998; Takeuchi, 1999b; Du, 2000; Hemmi, 2000; Chuang, 2001]. Bis dato wurden für fast alle TLR-Proteine Agonisten identifiziert, welche zumeist mikrobiellen Ursprungs sind. Durch den Prozess der Rezeptorheterodimerisierung wird das Repertoire an Strukturen, welche durch TLRs erkannt werden, zusätzlich erhöht. So können manche TLRs untereinander in Wechselwirkung treten und somit zusätzliche PAMPs detektieren [Ozinsky, 2000].

Neuere Untersuchungen haben ferner ergeben, dass manche TLRs auch auf endogene Bestandteile reagieren, die z.B. von beanspruchten oder geschädigten Zellen freigesetzt werden. Unter diese Gruppe lassen sich unter anderem Hitzeschockproteine [Ohashi, 2000], fragmentierte Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Fibronektin [Okamura, 2001] oder Hyaluronan [Termeer, 2002] und auch Chromatin [Leadbetter, 2002] subsummieren.

Für einen Überblick zu dem aktuellen Wissen über bekannte TLR-Agonisten sei auf Tabelle 1 beziehungsweise entsprechende Übersichtsartikel verwiesen [Barton, 2002b; Underhill 2003].

| TLR | PAMP | Herkunft | Referenz |
|---|---|---|---|
| TLR1 | kooperiert mit TLR2 | | |
| TLR2 | Lipoproteine | Gram-positive Bakterien | [Takeuchi, 1999a] |
| | Zyomosan | Hefen | [Ozinsky, 2000] |
| | *Macrophage-activating lipopeptide 2* (MALP-2) | Mykoplasmen | [Takeuchi, 2000] |
| | Lipoarabinomannan (LAM) | Mykobakterien | [Underhill, 1999] |
| TLR3 | doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA) | Viren | [Alexopoulou, 2001] |
| TLR4 | LPS | Gram-negative Bakterien | [Poltorak, 1998; Hoshino, 1999] |
| | Protein F | RSV | [Kurt-Jones, 2000] |
| | Hsp 60 | Wirt | [Ohashi, 2000] |
| | Hyaluronan | Wirt | [Termeer, 2002] |
| | Fibronektin | Wirt | [Okamura, 2001] |
| TLR5 | Flagellin | | [Hayashi, 2001] |
| TLR6 | kooperiert mit TLR2 | | |
| TLR7 | Guanosin-Analoga | nicht bekannt | [Hemmi, 2002] |
| TLR8 | Guanosin-Analoga | nicht bekannt | [Jurk, 2002] |
| TLR9 | CpG-Motive | Bakterien, Viren | [Hemmi, 2000] |
| TLR10 | nicht bekannt | nicht bekannt | |

**Tabelle 1 Humane *Toll-like*-Rezeptoren und ihre Liganden**

1.1.3.4. Signaltransduktion durch *Toll-like*-Rezeptoren

Der Arbeitsgruppe um Rock gelang es, die allgemeingültigen strukturellen Eigenschaften der TLR-Familie zu erarbeiten – das Vorhandensein multipler Leucin-reicher Sequenzabschnitte in der Ektodomäne und die *Toll*-homologe Domäne im zytoplasmatischen Abschnitt aller Mitglieder dieser Protein-Familie [Rock, 1998]. Diese intrazytoplasmatische Region, welche entscheidend für die Signaltransduktion des jeweiligen TLR-Proteins ist, wurde aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu dem Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) als Toll/ IL-1R-Domäne (TIR) benannt. Analog dem IL-1R nutzen die meisten heute bekannten TLRs den *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) als Adapterprotein, welcher stereotyp eine „inflammatorische Basisantwort“ hauptsächlich via den *nuclear factor kappa B* (NF-κB) induziert. Verschiedene TLRs können jedoch eine unterschiedliche Genexpression in dem gleichen Zelltyp induzieren. Auch zeigte sich, dass in MyD88-defizienten Mäusen zwar die TLR-vermittelte Zytokinproduktion aufgehoben ist, es aber dennoch zu einer

LPS-abhängigen Induktion von Interferon-induzierbaren Genen und der Ausreifung von DCs kommt [Kawai, 1999; Kaisho, 2001; Kawai, 2001]. Dieser MyD88-unabhängige Signaltransduktionsweg könnte eine Erklärung für die einzigartigen biologischen Antworten einzelner TLRs darstellen, insbesondere für TLR2 [Yamamoto, 2002a], TLR3 [Alexopoulou, 2001] und TLR4 [Toshchakov, 2002]. So scheint neben MyD88 das zusätzliche Adapterprotein *TIR domain containing adapter protein* (TIRAP) zumindest für TLR2 und TLR4 in der Induktion proinflammatorischer Zytokine via NF-κB notwendig zu sein [Horng, 2002; Yamamoto, 2002a]. Das kürzlich beschriebene Adapterprotein *TIR domain-containing adapter inducing IFN-β* (TRIF) induziert hingegen MyD88-unabhängig via den *IFN regulatory factor 3* (IRF3) die Transkription von IFN Typ I. Dies scheint wiederum eine entscheidende Rolle in der Aktivierung über TLR3 und TLR4 zu spielen [Yamamoto, 2002b; Oshiumi, 2003].

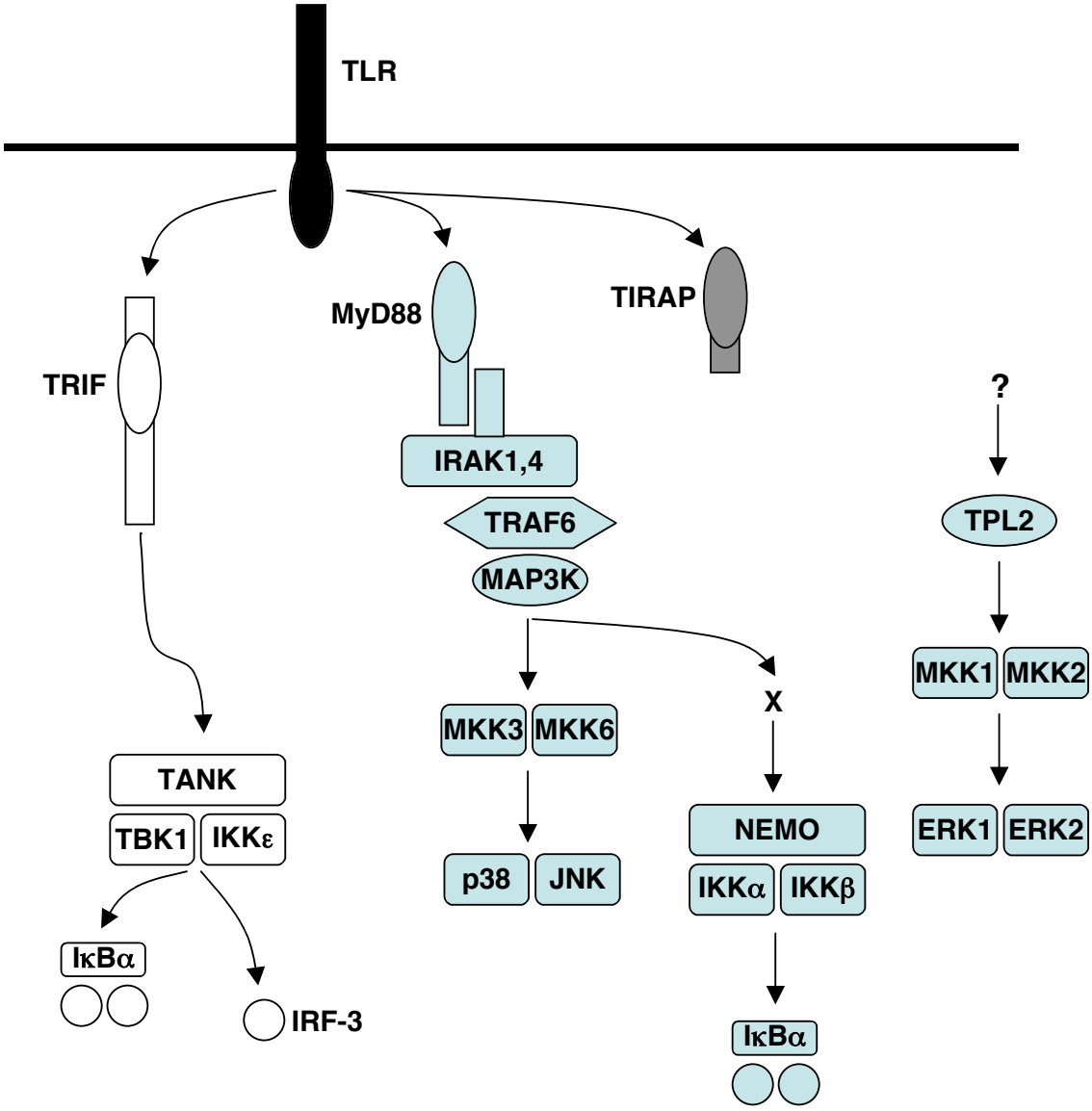


**Abb. 1 Signaltransduktion durch *Toll-like*-Rezeptoren**

TLRs rekrutieren die IL-1R-assoziierte Kinase 1 und 4 (IRAK 1/ 4) über das Adapterprotein MyD88, welche dann wiederum den TNFR-assoziierten Faktor 6 (TRAF 6) phosphorylieren und aktivieren. In Abhängigkeit von TRAF 6 kommt es schließlich über mehrere Zwischenschritte zur Aktivierung der Stresskinasen c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und p38, der *extra-cellular signal-regulated kinase 1/ 2* (ERK 1/ 2) und des *inhibitor of NF-κBα* (IκBα)-Komplexes. Über letzteren Komplex kommt es zu einer Translokation von NF-κB in den Nukleus und damit zu einer Transkription von NF-κB-abhängigen Genen wie Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), Interleukin (IL)-1 und IL-6. MyD88-unabhängig kommt es via TRIF ebenfalls zu einer Aktivierung des IκBα-Komplexes und zusätzlich zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3.

## 1.2. Effektormechanismen der angeborenen Immunität

### *1.2.1. Interferone*

1957 wurde Interferon (IFN) von Isaacs und Lindenmann als ein Protein beschrieben, das in lebenden Zellen nach Stimulation mit Hitze-inaktivierten Influenzaviren induziert wurde [Isaacs, 1987]. Die Zugabe dieses Proteins zu virusinfizierten Zellen interferierte mit der viralen Replikation, so dass der Name Interferon geprägt wurde. Seit der ursprünglichen Entdeckung zeigte sich, dass mehrere IFN-Subtypen existieren, so dass man heute von einer Protein-Familie spricht. Interferone, die man entweder in IFN Typ I oder IFN Typ II einteilt, werden von verschiedenen Zellen produziert und binden an unterschiedliche Rezeptoren [Farrar, 1993; Pestka 2000]. IFN-$\gamma$ ist der einzige Vertreter des IFN Typ II und wird hauptsächlich von T-Zellen oder Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gebildet, die durch Antigene oder Zytokine stimuliert wurden. Dieses IFN wurde intensiv in sowohl normalen als auch pathologischen Immunantworten untersucht und wird heute als das wichtigste immunregulatorische Protein der IFN-Familie angesehen [Billiau 1996]. Die Familie des IFN Typ I, die sich aus mindestens 13 verschiedenen IFN-$\alpha$-Subtypen, einem IFN-$\beta$ und einem IFN-$\omega$ zusammensetzt, wird hauptsächlich als antivirale Proteinklasse angesehen, da sie besonders im Rahmen einer viralen Infektion gebildet wird und virale Resistenz in Zielzellen bewirkt. Typ I Interferone werden rasch auf mikrobielle Stimuli hin sezerniert und aktivieren eine Vielzahl von Effektorzellen sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems. IFN Typ I inhibiert unter anderem direkt eine Virus-Replikation in infizierten Zellen [Isaacs, 1957], steigert die Zytotoxizität von Makrophagen und NK-Zellen [Ortaldo, 1983], fördert die Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen durch die Induktion von IL-15 [Zhang, 1998], erhält aktivierte T-Zellen am Leben [Marrack, 1999] und begünstigt ferner Antikörperproduktion durch B-Zellen [Le Bon, 2001]. Im Besonderen ist IFN Typ I unabdingbar in der Induktion einer effektiven spezifischen antiviralen Immunität [Muller, 1994] und spielt aber auch in der Immunantwort gegen Bakterien und Protozoen eine entscheidende Rolle [Bogdan 2000].

### *1.2.2. Natürliche Killerzellen*

Der Terminus „Natürliche Killerzellen“ wurde durch die Beobachtung geformt, dass eine bestimmte lymphoide Zellpopulation fähig ist, ohne vorausgegangenen Stimulus

bestimmte Tumorzellen zu lysieren. Dieses rein funktionelle Kriterium blieb lange das einzige Klassifizierungsmerkmal, wobei Näheres zu ihrer Herkunft und den molekularen Mechanismen ihrer Funktion verborgen blieb [Trinchieri 1989]. Mehrere Untersuchungen konnten mittlerweile zeigen, dass NK- und T-Zellen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle abstammen [Mingari, 1991; Rodewald, 1992]; auch wurden in den letzten Jahren große Fortschritte in der Erforschung der molekularen Mechanismen ihrer „natürlichen“ Killeraktivität gemacht.

Trotz ihrer Verwandtschaft zu T-Zellen tragen NK-Zellen keinen rearrangierten, Antigen-spezifischen Rezeptor und benötigen für ihre Reifung keinen Thymus. Morphologisch sind die relativ großen Zellen durch azurophile Granula im Zytoplasma gekennzeichnet und lassen sich durch die Expression der Oberflächenmarker CD56 und CD16 von anderen Lymphozyten abgrenzen. Der für T-Zellen typische CD3-Komplex fehlt dagegen. Die Haupteffektormechanismen von NK-Zellen sind Zytokinproduktion (insbesondere IFN-$\gamma$, TNF-$\alpha$ und GM-CSF) und Zytotoxizität. NK-Zellen sind in der Lage, sowohl infizierte als auch maligne Zellen zu zerstören. Sie erkennen ihre Zielzellen auf zwei verschiedene Arten:

Wie viele andere Immunzellen exprimieren NK-Zellen sogenannte Fc$\gamma$-Rezeptoren, welche Immunglobuline der Klasse IgG über ihren konstanten Abschnitt binden können. Über diese Fc-Rezeptoren binden NK-Zellen IgG-besetzte Zielzellen und erkennen diese über einen Mechanismus, den man Antikörper-vermittelte zellgebundene Zytotoxizität (ADCC) nennt. Dieser Mechanismus lässt sich auch als indirekt-adaptiv bezeichnen, zumal die NK-Zellen auf die eigentliche Antigenerkennung durch die Antikörper keinen Einfluss nehmen und lediglich als verlängerter Arm der adaptiven Immunantwort die Zielzellen lysieren.

Der zweite Mechanismus, über den NK-Zellen ihre Ziele erkennen, ist abhängig von den NK-spezifischen *killer-activating receptors* und *killer-inhibitory receptors* (KIRs), welche die eigentliche „natürliche“ Killeraktivität ausmachen. Die *killer-activating receptors* erkennen eine Reihe von noch nicht identifizierten Molekülen auf kernhaltigen Zellen, während die KIRs mit *major histocompatibility complex* Klasse I (MHC-I)-Molekülen interagieren. Werden die aktivierenden Rezeptoren durch ihre Bindungspartner auf der Zielzelle ligiert, so wird die NK-Zelle „lizenziert“ ihr Ziel zu töten. Normalerweise wird dieses Tötungssignal jedoch durch gleichzeitige Bindung der KIRs an entsprechende MHC-I-Moleküle über inhibitorische Signale aufgehoben. Obwohl alle kernhaltigen Zellen normalerweise MHC-I-Moleküle dauerhaft auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, können sie unter bestimmten Bedingungen diese Fähigkeit

verlieren. Zu diesem Verlust kommt es typischerweise bei maligner Transformation der Zelle oder mikrobieller Interferenz bei Infektion, was der „entarteten“ Zelle als Selektionsvorteil dient, um dem Erkennungsmechanismus durch CD8+ T-Zellen zu entgehen. Diese Zellen werden jedoch im Idealfall durch NK-Zellen detektiert und lysiert, da das Fehlen der MHC-I-Moleküle ein inhibitorisches Signal verhindert, während aktivierende Rezeptoren die NK-Zelle noch immer stimulieren. Dieser schon 1990 postulierte Sachverhalt wird als sogenannte *missing self* Theorie [Ljunggren, 1990] bezeichnet und hat in den letzten Jahren zum großen Teil empirisch Bestätigung gefunden.

Die Hauptcharakteristika und Funktionen von NK-Zellen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

| Hauptcharakteristika/ Funktionen | Referenz |
|---|---|
| Im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen exprimieren NK-Zellen konstitutiv eine „lytische Maschinerie“ und lysieren Zielzellen MHC-unabhängig, ohne vorausgegangene *in vitro*- oder *in vivo*-Aktivierung. | [Trinchieri 1989] |
| Virusinfizierte und maligne transformierte Zellen mit mangelnder MHC-I-Expression werden von NK-Zellen lysiert. | [Ljunggren, 1990; Yokoyama, 1993; Moretta, 1996; Lopez-Botet, 1997; Lanier 1998; Biron, 1999; Long 1999] |
| Nach Aktivierung produzieren NK-Zellen verschiedene Zytokine (IFN-$\gamma$, TNF-$\alpha$ und GM-CSF)und Chemokine, die eine Entzündungsantwort fördern und eine Immunantwort in Richtung TH1 modulieren. | [Trinchieri 1995; Biron, 1999] |
| NK-Zellen beteiligen sich an der Eradikation verschiedener Pathogene durch Mechanismen der ADCC | [Trinchieri 1989; Trinchieri 1995] |
| Im murinen System werden durch NK-Zellen Tumorwachstum und Metastasierung gehemmt. | [Kim, 2000] |

**Tabelle 2 Hauptcharakteristika und Funktionen von NK-Zellen**

### *1.2.3. $\gamma\delta$ T-Zellen*

Wie oben aufgeführt ist die große Vielfalt an unterschiedlichen Antigenrezeptoren ein herausragendes Charakteristikum der Lymphozyten der adaptiven Immunität, welche durch den Mechanismus des somatischen Gen-Rearrangements zu Stande kommt. Zusätzlich gibt es jedoch kleine Lymphozytensubpopulationen, die lediglich Rezeptoren einer limitierten Vielfalt tragen. Diese Lymphozyten reagieren unmittelbar auf ihr spezifisches Antigen mit entsprechender Effektorfunktion und müssen nicht den

Prozess der klonalen Expansion durchlaufen, was somit eine genaue Kategorisierung dieser Zellen in angeborene respektive adaptive Immunität schwer fallen lässt.

Eine solche Subpopulation ist die Gruppe der γδ T-Zellen, deren Existenz zufällig auf der Suche nach den αβ TZR-kodierenden Genen entdeckt wurde [Saito, 1984; Chien, 1987]. γδ T-Zellen exprimieren typischerweise einen Gewebe-spezifischen, restringierten Satz an γ- und δ-Genen der variablen Kette des TZRs, die sich zu ihrer Typisierung heranziehen lassen. So tragen z.B. beim Menschen die meisten γδ T-Zellen der Nasenschleimhaut einen Vδ1-positiven Rezeptor, während hingegen der Großteil der γδ T-Zellen im peripheren Blut Vγ9/ Vδ2-positiv sind.

Die Mechanismen, die für die Formung des Repertoires an Antigen-Rezeptoren von γδ T-Zellen verantwortlich sind, sind bisher nicht völlig bekannt. Intrinsische und genetische Faktoren scheinen primär für die Generierung spezifischer γδ T-Zell-Subpopulationen verantwortlich zu sein, wobei extrinsische Faktoren später modulierend einwirken und bestimmte Klone expandieren. Während der embryonalen Entwicklung der Maus tauchen in Wellen TZR-homogene γδ T-Zell-Populationen auf, die unterschiedliche epitheliale Gewebe besiedeln. So kommt es am 14. Tag der Embryonalentwicklung zu einer Besiedlung der Haut durch Vγ5-positive Klone, die sich dendritenartig um Keratinozyten sammeln und deshalb auch dendritische epidermale T-Zellen genannt werden [Ikuta, 1990]. Es bestehen Hinweise, dass diese Prozesse Antigen-unabhängig durch „Vorprogrammierung“ gesteuert werden, jedoch zeigen auch neuere Experimente, dass Antigene in der Selektion dieser invarianten γδ T-Zell-Klone eine wesentliche Rolle spielen (Übersicht siehe [Carding, 2002]). Auch im humanen System herrschen bestimmte γδ T-Zell-Populationen in verschiedenen Geweben vor, auch wenn die Verteilung hier nicht so strikt ist wie im murinen System.

Im peripheren Blut des gesunden Probanden machen γδ T-Zellen ca. 1 - 15 % des zirkulierenden T-Lymphozytenpools aus. Der Großteil (ca. 80 %) der γδ T-Zellen im peripheren Blut ist sowohl CD4 als auch CD8-negativ, lediglich 20 % sind schwach positiv für CD8. CD4+ γδ T-Zellen sind extrem selten [Jitsukawa, 1987]. Ihr Phänotyp ist gekennzeichnet durch typische Charakteristika von Gedächtnis-T-Zellen - Hinweis auf die stetige Antigen-Restimulation, der sie unterliegen. Das humane γδ T-Zell-Repertoire wird durch postnatale Expansion so beeinflusst, dass Vγ9/ Vδ2-positive γδ T-Zellen mehr als 97 % der γδ T-Zellen des peripheren Blutes des Erwachsenen ausmachen. Für diese persistierende Prädominanz einer einzelnen

Subpopulation von γδ T-Zellen sind mit großer Wahrscheinlichkeit Antigene häufig vorkommender Mikroben und Pflanzen verantwortlich.

Die Antigenerkennung durch γδ T-Zellen unterscheidet sich fundamental von αβ T-Zellen, da sie nicht an prozessierte und im MHC-Kontext präsentierte Peptide gebunden ist. Funktionell ähnelt sie eher der von B-Zellen durch Antikörper als der von αβ T-Zellen, zumal γδ T-Zellen in der Lage sind, sowohl Protein- als auch Nicht-Protein-Antigene zu erkennen [Hayday 2000]. Versuche haben gezeigt, dass γδ T-Zell-Klone einerseits Antigene erkennen, die konstitutiv auf einem breiten Spektrum von Wirtszellen und pathogenen Keimen präsentiert werden, andererseits Antigene, die lediglich induzierbar oder auf eine bestimmte Zellpopulation restringiert exprimiert werden. Die erste Kategorie beinhaltet die Nicht-Protein Pyrophosphate und Alkylamine, die sich in Bakterien, Pflanzen und Tierzellen nachweisen lassen und ferner Hitzeschockprotein-homologe Proteine von Bakterien und Säugern. Eine Reaktivität auf diese Antigene findet sich typischerweise unter den γδ T-Zellen der lymphoiden Organe und des peripheren Blutes.

Die zweite Antigen-Kategorie setzt sich hauptsächlich aus Zell-assoziierten Antigenen zusammen, vertreten durch MHC-I-ähnliche Proteine, die insbesondere durch Stress, Entzündung oder Infektion induziert werden und auf bestimmte Zellarten (z.B. Epithelien) beschränkt bleiben. Konsequenterweise sind es hier hauptsächlich Epithel-assoziierte γδ T-Zellen, die auf diese Antigene reagieren.

Auf Antigenkontakt reagieren γδ T-Zellen ähnlich wie NK-Zellen mit einer prompten Effektorfunktion. Nach Aktivierung durch ihr spezifisches Antigen sind sie in der Lage, rasch proinflammatorische Zytokine und Chemokine auszuschütten und auch ihre zytotoxische Aktivität zu entfalten. Viele frisch isolierte γδ T-Zellen können dabei ohne weitere Aktivierung *in vitro* bestimmte Zellen lysieren und ähneln damit in soweit NK-Zellen, als sie die Fähigkeit zur Zytolyse konstitutiv exprimieren [Nakata, 1990].

Auch wenn mittlerweile viele verschiedene γδ T-Zell-Antigene identifiziert sind und ferner mehrere Erkrankungen beschrieben sind, bei denen es zu einer selektiven Proliferation bestimmter γδ T-Zell-Subpopulationen kommt, gestaltet sich eine genaue Funktionszuordnung der γδ T-Zelle im Immunsystem bis heute schwierig. Mausversuche lassen vermuten, dass während einer Infektion γδ T-Zellen in Abhängigkeit vom Stadium der Infektion verschiedene Funktionen einnehmen, die sich unter anderem von der anatomischen Lokalisation ableiten lassen. Epithel-assoziierte γδ T-Zellen sind ideal lokalisiert, um in der frühen Phase einer Infektion vor Ort

proinflammatorische Zytokine und Chemokine auszuschütten. Hierdurch können sie Lymphozyten rekrutieren und die folgende adaptive Immunantwort durch ihr produziertes Zytokinprofil modulieren. Insbesondere Mausversuche haben gezeigt, dass γδ T-Zellen jedoch auch eine bedeutende anti-inflammatorische Funktion in der Terminierung einer lokalen Immunantwort einnehmen. Hier schienen besonders γδ T-Zellen lymphoider Herkunft eine Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass γδ T-Zellen des peripheren Blutes in Mäusen, die mit Listeria monocytogenes infiziert wurden, eine überschießende Immunantwort verhindern [Mombaerts, 1993].

Eine bedeutende Funktion wird γδ T-Zellen weiterhin in der Immunüberwachung von Tumoren zugeschrieben. Wie oben beschrieben finden Epithel-assoziierte γδ T-Zellen hauptsächlich in Stress-induzierten Molekülen ihre Liganden. Zu diesen Liganden zählen unter anderem MICA und MICB, MHC-I-ähnliche Moleküle, die ähnlich wie Hitzeschockproteine in geschädigten, infizierten und transformierten Zellen induziert werden. Werden Epithel-assoziierte γδ T-Zellen normalerweise durch inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren „in Schach“ gehalten, kommt es bei Induktion von MICA und MICB zur Aktivierung von spezifischen γδ T-Zellen und sukzessiver Lyse der entarteten Zielzelle [Groh, 1998].

## 1.3. Dendritische Zellen – Mittler zwischen angeborener und adaptiver Immunität

DCs zeichnen sich durch einzigartige Eigenschaften aus, die es ihnen ermöglichen, eine effektive und spezifische Immunantwort gegen eindringende Pathogene zu induzieren. Vereinfacht lässt sich die häufig propagierte „Wächterfunktion“ der DC wie folgt zusammenfassen:

DCs liegen in nahezu allen peripheren Geweben des Körpers in einem dichten Netzwerk vor und analysieren ihre Umgebung indem sie extrazelluläre Bestandteile durch Phagozytose und Endozytose aufnehmen, diese prozessieren und als Peptide auf ihrer Oberfläche im MHC-Kontext präsentieren. Potenzielle antigene Bestandteile der Umgebung werden somit „sichtbar“ für αβ T-Zellen gemacht, die erst durch Präsentation prozessierter Peptide im MHC-Kontext in der Lage sind, Antigene zu erkennen. Jeglicher Kontakt mit einem Gefahrensignal veranlasst die DCs, das Gewebe zu verlassen und in den drainierenden Lymphknoten auszuwandern. Dort interagieren sie in sogenannten T-Zell-Arealen mit T-Zellen. In Abhängigkeit von ihrem

Aktivierungsgrad sind sie in der Lage, entweder Toleranz gegenüber dem präsentierten Antigen zu induzieren oder eine spezifische T-Zell-Immunantwort zu initiieren. Die Induktion einer adaptiven Immunantwort wird erst dadurch erreicht, dass T-Zellen, die ihr spezifisches Antigen auf der DC im MHC-Kontext erkennen (Signal I), durch kostimulatorische Moleküle der DC aktiviert werden (Signal II).

Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass die Induktion einer effektiven T-Zell vermittelten Immunantwort entscheidend durch das kostimulatorische Potential einer DC bestimmt wird. Unreife DCs liefern der T-Zelle lediglich das spezifische Antigen (Signal I) ohne adäquate Kostimulation (Signal II), so dass Toleranz bzw. Anergie gegenüber diesem Antigen induziert wird [Dhodapkar, 2001]. Erst durch voll ausgereifte DCs, die zusätzlich ein adäquates zweites Signal bieten kommt es zu einer effektiven $\alpha\beta$ T-Zell-vermittelten Immunantwort [Shortman, 2001]. Konsequenterweise rücken diese Beobachtungen die DC in den Mittelpunkt der adaptiven Immunität - ist es doch sie, die somit mittels ihrer kostimulatorischen Fähigkeit über Anergie oder Aktivierung „entscheidet“. Die Regulation dieses Mechanismus war lange nicht verstanden, und erst in den letzten Jahren bewahrheitete sich durch die Charakterisierung der sogenannten PRRs C. Janeways Hypothese der Verknüpfung von angeborener und adaptiver Immunität. So zeigte sich, dass eine effektive Aktivierung bzw. Ausreifung von DCs und anschließende Induktion einer Immunantwort hauptsächlich durch eine Stimulation mit mikrobiellen Bestandteilen erreicht wird [Medzhitov, 1997a]. Jedoch werden auch endogene Gefahrensignale von DCs detektiert. So bringen nekrotische Zellen DCs zur Ausreifung, während apoptotische Zellen keine Aktivierung auslösen, obwohl in beiden Situationen antigene Bestandteile von DCs prozessiert und T-Zellen präsentiert werden [Gallucci, 1999].
Wie oben schon ausführlich dargestellt wurde, wird der Erkennungsprozess von potenziellen Gefahrensignalen durch die sogenannten PRRs erreicht, welche hoch-konservierte PAMPs erkennen. Es ist somit nicht verwunderlich, dass DCs ein breites Spektrum an PRRs exprimieren, welches von Scavenger-Rezeptoren bis zu TLRs reicht [Kadowaki, 2001b; Krug, 2001b].

Neben der Fähigkeit eine adaptive Immunantwort zu induzieren sind DCs ferner in der Lage, unmittelbar auf einen pathogenen Stimulus durch Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen zu reagieren. So tragen sie auch dazu bei, dass weitere Immunzellen zum Focus der Infektion rekrutiert werden und Effektorzellen der angeborenen Immunität aktiviert werden [Mellman, 2001].

Seit ihrer ursprünglichen Erstbeschreibung durch Steinman et al. hat sich gezeigt, dass DCs eine heterogene Population von Zellen darstellen, die sich in Ursprung und Stadien der Differenzierung unterscheiden und weiterhin durch unterschiedliche spezifische Funktionen und migratorische Profile charakterisiert sind. Ein objektives morphologisches Kriterium, welches die eindeutige Zuordnung einer Zelle in die DC-Population erlaubt, ist bis dato nicht verfügbar, so dass lediglich oben beschriebene funktionelle Charakteristika genügen müssen. Im humanen System lassen sich zumindest phänotypisch zwei verschiedene DC-Subpopulationen des peripheren Blutes unterscheiden – die myeloide unreife CD11c+ DC (MDC) und die CD11c- plasmazytoide DC (PDC) [O'Doherty, 1994]. Die Expression lymphoider Marker in PDCs, jedoch nicht in MDCs, lässt vermuten, dass DCs entweder von lymphoiden oder myeloiden Vorstufen abstammen. Diese Vermutung wird ferner dadurch bestärkt, dass unterschiedliche Wachstumsfaktoren als auch Transkriptionsfaktoren für ihre Entwicklung notwendig sind [Spits, 2000]. Weiterhin hat sich gezeigt, dass diese zwei DC-Populationen unterschiedliche Profile an PRRs exprimieren, was zu der Annahme geführt hat, dass sich diese DCs im Laufe der Evolution „spezialisiert“ haben, unterschiedliche Pathogene zu erkennen [Shortman, 2002].

### *1.3.1. Die plasmazytoide dendritische Zelle*

#### 1.3.1.1. Die Entdeckung der T-assoziierten „Plasmazellen“

1958 beschrieben K. Lennert und W. Remmele, Pathologen an der Universität Frankfurt, eine neue Population von „Plasmazellen“, die sie fortan T-assoziierte „Plasmazellen“ nannten. Die klassischen Antikörper-produzierenden Plasmazellen waren bis dahin lediglich in der Markregion des Lymphknotens, der roten Milzpulpa, der Lamina propria der Mukosa und im Knochenmark beschrieben. Die von Lennert et al. beschriebenen Zellen waren jedoch eindeutig im T-Zell-Areal des aktivierten Lymphknotens lokalisiert und glichen in ihrer Morphologie den bekannten Plasmazellen [Lennert, 1958]. Das reichlich vorhandene endoplasmatische Retikulum deutete auf eine sezernierende Tätigkeit dieser Zellen hin, als Sekretionsprodukt wurden Immunglobuline vermutet.

25 Jahre nach Erstbeschreibung durch Lennert und Remmele sorgte eine Veröffentlichung von Feller et al. zu einer Umbenennung der „T-assoziierten Plasmazellen“ in "plasmazytoide T-Zellen" (PTZ). Die Autoren konnten nachweisen,

dass CD4 (OKT4) auf den aussergewöhnlichen Zellen exprimiert wurde – ein bis dato bekannter Marker für T-Helfer Zellen. B-Zell-Antigene oder Immunglobuline ließen sich jedoch auf den Zellen nicht nachweisen, auch schienen B-Zellen an der Reaktion der PTZ im aktivierten Lymphknoten unbeteiligt zu sein. Die Autoren folgerten, dass es sich hier um das T-Zell-Pendant zu der klassischen B-Plasmazelle handele, deren Aufgabe es sei, T-Zell-Lymphokine anstelle von Immunglobulinen zu produzieren [Feller, 1983]. Facchetti stellte schließlich 1988 den Namen „plasmazytoide T-Zelle“ in Frage, indem er nachwies, dass eine Reihe myelomonozytärer Oberflächenantigene auf der sogenannten PTZ exprimiert wurde, während die TZR-Komponente CD3 auf den Zellen nicht nachweisbar war. Er formte daraufhin den Begriff „plasmazytoider Monozyt“ [Facchetti, 1988]. Folgende Publikationen zeigten, dass die Anzahl „plasmazytoider Monozyten“ in zahlreichen hämatologischen Erkrankungen erhöht ist, wobei die Bedeutung dieses Phänomens jedoch unklar blieb [Facchetti, 1989a; Facchetti, 1989b; Facchetti, 1989c].

#### 1.3.1.2. Die plasmazytoide dendritische Zelle

Eine zweiter Hinweis kam aus dem Forschungsfeld der DCs, welche 1973 von Steinman und Mitarbeitern an der Rockefeller Universität in New York entdeckt wurden [Steinman, 1973]. 1994 gelang es dieser Arbeitsgruppe, zwei unterschiedliche Subpopulationen (CD11c+ und CD11c-) von CD4-positiven primären DCs im peripheren Blut zu identifizieren [O'Doherty, 1994]. Liu und Mitarbeiter konnten schließlich 1997 zeigen, dass der Plasmazytoide Monozyt identisch ist mit der schon 1994 beschriebenen *lineage*-negativen, CD4-positiven und CD11c-negativen Vorläufer- DC des peripheren Blutes [Grouard, 1997]. In histologischen Schnitten von humanen Tonsillen konnten plasmazytoide Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft hoher endothelialer Venolen (HEV), den Eintrittspforten von Immunzellen in den Lymphknoten, nachgewiesen werden. Diese plasmazytoiden Zellen ließen sich mittels eines Depletionsverfahrens aus humanen Tonsillen anreichern und konnten erfolgreich *in vitro* kultiviert werden, wobei sich herausstellte, dass IL-3 den entscheidenden Überlebens- als auch Differenzierungsfaktor für diese Zellpopulation darstellt. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde schließlich von Olweus et al. gezeigt, dass plasmazytoide Zellen durch die Expression der IL-3-Rezeptorkette alpha (CD123) identifiziert werden können [Olweus, 1997]. Aus dem „plasmazytoiden Monozyt“ wurde somit die „plasmazytoide dendritische Zelle“.

1.3.1.3. Die natürliche Typ-I-Interferon-produzierende Zelle

Lange wurde angenommen, dass die meisten humanen Blutzelltypen fähig seien, auf eine Virusinfektion hin IFN Typ I zu produzieren. Schon Ende der siebziger Jahre zeigte sich jedoch, dass es einen Hauptzelltyp geben muss, der IFN Typ I produziert [Fitzgerald-Bocarsly 1993]. Diese sogenannten Interferon-produzierenden Zellen (IPC) waren negativ für Oberflächenmarker und Eigenschaften der klassischen hämatopoetischen Stammreihen (T-, B-, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen), jedoch positiv für CD4 und MHC-II. Es wurde lange kontrovers diskutiert, ob diese natürliche IPC einer eigenständigen *lineage* zuzuordnen sei [Chehimi, 1989; Starr, 1993], oder ob es sich hier um eine DC handele [Perussia, 1985; Feldman, 1990]. Svensson publizierte schließlich 1996 eine ziemlich genaue und umfassende Analyse zum Phänotyp der IPC und deutete erstmals in die Richtung der von O'Doherty postulierten *immature* DC [Ghanekar, 1996; Svensson, 1996]. Drei Jahre später enthüllten zwei Forschergruppen fast zeitgleich die wahre Identität der natürlichen IPC. Die Arbeitsgruppe Siegal und Liu konnte durch Aufreinigungsexperimente zeigen, dass PDC-Präkursoren der natürlichen IPC entsprechen [Siegal, 1999]. Kurze Zeit später war es der Arbeitsgruppe Cella und Colonna möglich, diese Beobachtung zu bestätigen und zusätzlich zu zeigen, dass PDCs im Lymphknoten *in situ* IFN Typ I produzieren [Cella, 1999]. Somit war letztlich die Identität der enigmatischen IPC gelüftet, wobei das junge Forschungsfeld bald durch neue Fragestellungen gefordert wurde.

### *1.3.2. Die myeloide dendritische Zelle*

DCs myeloiden Ursprungs finden sich im humanen System, neben den bereits erwähnten CD11c-positiven Vorläuferzellen des peripheren Blutes, als gewebsständige Zellen in praktisch allen menschlichen Organen. Die meisten Einblicke in die Biologie dieser Zellen stammen jedoch nicht aus der Isolation dieser Zellen aus Gewebe, sondern aus *in vitro*-Kultur Studien. So lassen sich aus CD34+ Stammzellen [Caux, 1997], CD14+ Monozyten [Romani, 1994] oder aus CD11c+ Vorläuferzellen des peripheren Blutes [Ito, 1999] durch Kultur mit verschiedenen Zytokinzusätzen MDCs differenzieren und generieren. Während ihres unreifen Stadiums sind diese DCs äußerst effizient in der Aufnahme und Prozessierung von Antigenen. Durch Zugabe eines geeigneten Ausreifestimulus sind diese DCs ferner in der Lage, große Mengen an IL-12 zu produzieren, welches schließlich naive CD4+ T-Zellen in

IFN-γ-produzierende TH1-Zellen polarisiert [Guermonprez, 2002]. Die Möglichkeit, diese DCs in großen Mengen und in relativ kurzer Zeit *in vitro* zu generieren, machen sie zu einer interessanten therapeutischen Option als „natürliches Adjuvans“. MDCs werden daher zurzeit in zahlreichen klinischen Studien als zelluläres Impfadjuvans in verschiedenen Strategien der therapeutischen Vakzinierung gegen Tumoren eingesetzt [Fong, 2000].

## 1.4. Zelluläre Bestandteile der adaptiven Immunität

### *1.4.1. αβ T-Zellen*

αβ T-Zellen stellen mit einem Anteil von ca. 70 % die größte Lymphozytenpopulation aller mononukleären Zellen der peripheren Blutes (PBMC) dar. Die einzelnen reifen αβ T-Zellen tragen an ihrer Oberfläche entweder den CD4- oder den CD8-Korezeptor. Mit ihrem durch das Genrearrangement jeweils einzigartigen TZR können sie Antigene erkennen, die ihnen in prozessierter Form als kurzkettige Peptide in sogenannten MHC-Molekülen präsentiert werden.

Für αβ T-Zellen sind Antigene dabei definiert als Fremd-Peptide, gebunden an MHC-I-Moleküle bei CD8-positiven Zellen und an MHC-II-Moleküle bei CD4-positiven Zellen. Dies ist die Folge eines Selektionsprozesses im Thymus, der nur αβ T-Zellen mit TZRs zulässt, die mit geringer Affinität an die eigenen MHC-Moleküle binden (positive Selektion/ MHC-Restriktion), jedoch Rezeptoren ausschließt, die spezifisch sind für MHC/ Selbst-Peptid-Komplexe (negative Selektion). Die diesen Selektionsprozess überstehenden Zellen sind dann spezifisch für Fremd-Peptide, präsentiert durch die eigenen MHC-Moleküle, und damit MHC-restringiert. Native Fremd-Antigene, die nicht zu Peptidstücken prozessiert und in MHC-Molekülen präsentiert werden, können durch αβ T-Zellen im Normalfall nicht erkannt werden. Für eine vollständige erste Aktivierung benötigen naive αβ T-Zellen neben der Erkennung ihres TZR-Liganden noch ein gleichzeitiges zweites, kostimulatorisches Signal, meist vermittelt durch Moleküle, die normalerweise nur auf professionellen APCs, insbesondere DCs (siehe oben), vorhanden sind. Nach diesem Vorgang der ersten Aktivierung, auch *priming* genannt, muss die ursprünglich einzelne Zelle erst proliferieren, klonal expandieren und sich in Effektorzellen differenzieren, bevor sie eine effektive Immunantwort bewirken kann. Diese "geprimten" αβ T-Zellen sind bei einem erneuten Antigenkontakt leichter zu aktivieren, und oft reicht hierbei die

Erkennung ihres TZR-Liganden auch ohne kostimulatorisches Signal aus, um ihre Effektormechanismen in Gang zu setzen. Die Funktionen, die αβ T-Zellen nach Antigen-Erkennung ausüben können, sind vielfältig. CD8+ αβ T-Zellen produzieren Zytokine und lysieren Zellen, die ihr Antigen tragen. CD4+ αβ T-Zellen stellen Signale und Zytokine bereit, die es B-Lymphozyten erlauben, zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen zu differenzieren und Makrophagen und CD8+ αβ T-Zellen dabei unterstützen, intrazelluläre Pathogene zu eliminieren (Übersicht siehe [Murphy, 2002]).

αβ T-Zellen können also als Gesamtsystem durch ihr TZR-Repertoire eine fast unendliche Zahl an Fremd-Peptiden erkennen und somit zu deren Eliminierung beitragen. Sie spielen damit eine bzw. die zentrale Rolle in der Abwehr gegen viele pathogene Bakterien, Parasiten, Viren und Tumoren, sind allerdings auch hauptverantwortlich für Abstoßungsreaktionen in der Transplantationsmedizin.

## 1.5. CpG-Oligodesoxynukleotide als Adjuvanzien in der Immuntherapie

### *1.5.1. Von bakteriellen Lysaten zu CpG-Oligodesoxynukleotiden*

Anekdotische Berichte über den heilsamen Effekt bakterieller Infektionen auf den Ausgang maligner Erkrankungen reichen bis in das 17. Jahrhundert zurück. Ende des 19. Jahrhunderts versuchten mehrere Ärzte, sich diesen Effekt gezielt zu Nutze zu machen, indem sie künstlich Patienten mit Bakterien oder Bakterienbestandteilen inokulierten. Pionier auf diesem Gebiet war der New Yorker Chirurg William Coley, der versuchte, Patienten mit inoperablen Sarkomen mit bakteriellen Lysaten zu behandeln. Durch intratumorale Injektion von Lysaten aus Streptococcus pyogenes und Serratia marcescens konnte er erstaunliche Heilungsraten von über 10 % erreichen. Seine Ansätze der Tumor-Immuntherapie gerieten jedoch alsbald in Vergessenheit, zumal andere Ärzte seine Erfolge nicht reproduzieren konnten und ferner auch „modernere“, besser standardisierbare Verfahren wie die Strahlentherapie in den Mittelpunkt des Interesses rückten [Nauts, 1990; Coley 1991; Wiemann, 1994].

Fast 100 Jahre später erwachte neues Interesse an der Immuntherapie maligner Neoplasien mit bakteriellen Lysaten, unter anderem durch Untersuchungen einer japanischen Arbeitsgruppe zu der Anti-Tumor-Wirkung der Vakzinierung mit Bacille Calmette-Guérin (BCG), einem schwach virulenten Stamm von Mycobacterium bovis.

Die intravesikale Applikation von BCG hatte sich seit Einführung 1976 durch Morales zu einer Standardtherapie früher Tumorstadien des Blasenkarzinoms entwickelt [Morales, 1976], wobei jedoch der genaue Wirkmechanismus unbekannt blieb.

Erste Untersuchungen von Tokunaga et al. konnten nachweisen, dass das beobachtete reduzierte Tumorwachstum nach BCG-Impfung durch die Stimulation des Immunsystems erreicht wurde [Tokunaga, 1984; Tokunaga, 1999]. In den folgenden Untersuchungen konnte die Arbeitsgruppe eine Hauptkomponente der immunstimulatorischen Wirkung verblüffenderweise der mykobakteriellen Desoxyribonukleinsäure (DNA) zuordnen und schließlich aus diesen Beobachtungen den allgemeineren Schluss ziehen, dass bakterielle DNA als Immunstimulans wirksam ist [Yamamoto, 1992b]. Interessanterweise ließen sich ähnliche Effekte auch mit kurzen, einzelsträngigen DNA-Molekülen erzielen, die bestimmte Sequenzen enthielten [Yamamoto, 1992a]. Als strukturelle Voraussetzung einer immunstimulatorischen Wirkung dieser Oligodesoxynukleotide (ODN) wurde ein zentrales Cytidin-Guanosin (CG)-Dinukleotid gefordert, welches von Basen palindromartig flankiert wurde [Yamamoto, 1992a]. Tokunagas Arbeitsgruppe vermutete, dass eine palindromartige Anordnung der Basen notwendig sei um Sekundärstrukturen wie zum Beispiel „stem loops“ herauszubilden, um dem Vertebratenorganismus als Erkennungsstruktur zu dienen [Tokunaga, 1988; Kuramoto, 1992]. Sie sahen ihre Hypothese in der Beobachtung bestätigt, dass in ihren Versuchen sich selbst paarende Polynukleotide wie Poly-(dC,dG)-Nukleotide ebenfalls NK-Zell-Aktivierung verursachten [Tokunaga, 1988].

Unabhängig von diesen Ergebnissen wurde eine ähnliche Hypothese von der amerikanischen Arbeitsgruppe um Pisetsky aufgestellt, die beobachtete, dass bakterielle DNA murine B-Zellen zur Proliferation und Immunglobulinsekretion anregte [Messina, 1991]. In ihren Experimenten ließ sich ebenfalls ein stimulatorischer Effekt durch Poly-(dC,dG)-Nukleotide erzielen, wobei sie feststellten, dass die Methylierung der Base Cytosin eine Abnahme der Wirkung erbrachte [Messina, 1993]. Sie folgerten daraus, dass die Methylierung mit der Ausbildung von höheren Sekundärstrukturen der Polynukleotide interferiert und somit höhere Sekundärstrukturen der Polynukleotide der Schlüssel zur immunstimulatorischen Wirkung seien.

Arthur Krieg und Mitarbeiter machten schließlich 1995 die Beobachtung, dass bestimmte Oligodesoxynukleotide, die als Kontroll-ODNs bei Antisense-Experimenten eingesetzt wurden, B-Zellen stark zur Proliferation anregten. Anschließende Untersuchungen zur Identifikation der maximal stimulierenden ODNs ließen folgende

Gesetzmäßigkeiten erkennen: Unverzichtbarer Bestandteil eines stimulierenden ODNs ist ein zentrales CG-Dinukleotid. Sowohl Inversion zu GC als auch Methylierung am Cytosin heben den immunstimulierenden Effekt auf. Ein optimal stimulierendes ODN hat eine Basenlänge von ca. 20 Basen und die das CG-Dinukleotid flankierenden Basen haben einen Einfluss auf den stimulierenden Effekt des ODNs. Ein wichtiger Unterschied zu den Beobachtungen von Tokunaga, Pisetsky und Mitarbeitern war jedoch die Tatsache, dass die Anordnung der flankierenden Basen nicht palindromartig sein musste und auch die Herausbildung einer höheren Sekundärstruktur für die Wirkung nicht notwendig war [Krieg, 1995].

### *1.5.2. Die Erkennung von CpG-Motiven als Abwehrmechanismus*

Diese Beobachtungen konnten somit einen Erklärungsansatz bieten, warum das Immunsystem des Säugetiers zwischen eigener und bakterieller DNA zu unterscheiden vermag: Die Frequenz von CG-Dinukleotiden in Vertebraten DNA beträgt nur ca. ein Viertel der statistisch zu erwartenden Häufigkeit von 1 zu 16 und ferner sind diese CG-Dinukleotide in 80 Prozent der Fälle am Cytosin methyliert. Bakterielle DNA unterscheidet sich somit von Vertebraten-DNA durch einen zwanzigfach höheren Gehalt an unmethylierten CG-Dinukleotiden. In späteren Untersuchungen konnte ein weiterer Unterschied zwischen bakterieller DNA und Säugetier-DNA in Bezug auf CG-Dinukleotide gezeigt werden. So werden CG-Dinukleotide in Vertebraten-DNA von bestimmten Basen so flankiert, dass sie weniger immunstimulatorisch wirksam sind als es eine zufällige Basenverteilung bewirken würde [Han, 1994; Krieg, 1998b]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich diese immunstimulatorische Wirkung nicht nur auf bakterielle DNA beschränkt, sondern auch für Insekten-DNA, Nematoden-DNA und DNA weiterer Spezies zutrifft, so lange sie die oben beschriebenen CG-Motive enthalten [Sun, 1996; Sun, 1997].

Diese Beobachtungen formten die Hypothese, dass sich die „immunologische Detektion“ von CpG-DNA im Laufe der Evolution zu einem Verteidigungsmechanismus entwickelt hat, der es Vertebraten erlaubt, Fremd von Selbst zu unterscheiden. Die Entdeckung des Gefahrensignals CpG-DNA lieferte zudem eine schlüssige Erklärung für die bis dato rätselhafte unspezifische Wirkung von DNA-Vakzinen sowie den immunstimulatorischen Effekt mancher ODNs im Rahmen von Antisense-Experimenten [Tamm, 2001].

*1.5.3. Wirkung auf das Immunsystem*

Die überraschend guten Ergebnisse von Tokunaga und Mitarbeitern im Hinblick auf die starke anti-tumorale Wirkung von CpG-Motiv-haltigen Nukleinsäuren ermutigten zahlreiche Arbeitsgruppen, ähnliche Ansätze zu untersuchen, in denen CpG-DNA im Tierversuch zum Einsatz kam. Bald wurde deutlich, dass durch systemische CpG-Applikation ein starkes systemisches TH1-Zytokinmillieu geschaffen werden kann, welches sich durch hohe IFN-γ und IL-12-Spiegel auszeichnet [Klinman, 1996]. In Analogie hierzu führt eine lokale Applikation von CpG-DNA zu einer starken Induktion von TH1-Zytokinen im drainierenden Lymphknoten mit einer prominenten Lymphadenopathie am 7.-10. Tag [Lipford, 2000b]. DCs nehmen hierbei deutlich an Zahl zu und exprimieren einen aktivierten Phänotyp mit deutlicher Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen.

Bedingt durch dieses Zytokinmilieu zeigte sich insbesondere in Infektionsmodellen nicht nur in der prophylaktischen [Krieg, 1998a], sondern auch in der therapeutischen Applikation von CpG-DNA eine starke anti-mikrobielle Wirkung [Zimmermann, 1998]. So schützt die einmalige Gabe von CpG-Motiv-haltigen ODNs Mäuse vor der letalen Infektionsdosis mit intrazellulären Erregern wie Leishmanien oder Listerien [Zimmermann, 1998; Elkins, 1999]. Der Hauptmechanismus dieser Effekte liess sich auf die unspezifische Aktivierung der angeborenen Immunität zurückführen. Jedoch erwies sich CpG-DNA auch in der Induktion einer adaptiven Immunität sowohl in der prophylaktischen als auch in der therapeutischen Anwendung als außerordentlich effektiv. So haben mittlerweile zahlreiche Studien gezeigt, dass CpG-DNA ein potentes Adjuvans darstellt, um humorale und zelluläre Antigen-spezifische Immunantworten hervorzurufen (Modell-Protein und Peptid-Antigene [Chu, 1997; Lipford, 1997], bakterielle und virale Proteine [Davis, 1998; Moldoveanu, 1998], Tumorantigene [Sun, 1996] und Polysaccharide [Chelvarajan, 1999]). Im folgenden sollen kurz die bisher bekannten Effekte auf verschiedene Zellen des Immunsystems näher erläutert werden.

*1.5.4. Wirkung von CpG-DNA auf zellulärer Ebene*

1.5.4.1. B-Zellen

Optimale CpG-ODN-Sequenzen stellen außerordentlich starke Mitogene für B-Zellen fast aller Vertebraten dar und induzieren einen raschen Übertritt in die G1-Phase des Zellzyklus [Krieg, 1995; Hartmann, 2000a]. Innerhalb weniger Stunden kommt es zu

einer Produktion von IL-10 und IL-6, welche unter anderem für den nachfolgenden Übergang in IgM-produzierende B-Zellen notwendig ist [Yi, 1996b; Redford, 1998]. Neben der Induktion von Zytokinen und IgM-Produktion wird durch CpG-DNA-Stimulation auch eine vermehrte Expression von Oberflächenrezeptoren wie Fcγ, MHC-II, CD40, CD54 und kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 auf B-Zellen erreicht [Krieg, 1995; Davis, 1998; Hartmann, 2000a]. Schon geringe Konzentrationen von CpG-DNA wirken synergistisch mit einem adäquaten B-Zell-Rezeptor Signal, um reife periphere B-Zellen zu einer mehr als zehnfachen Proliferation, antigenspezifischer Antikörpersekretion und IL-6-Produktion anzuregen.
Neben den oben beschriebenen stimulatorischen Effekten verhindert CpG-DNA auch den spontanen Zelltod (Apoptose) von *in vitro* kultivierten primären B-Zellen [Yi, 1998a] und über den B-Zell-Rezeptor aktivierten Zelllinien [Yi, 1996a].

#### 1.5.4.2. Dendritische Zellen

Versuche mit humanen Monozyten und mit aus Monozyten generierten DCs gaben erste Hinweise, dass beim Menschen anders als bei der Maus Zellen der myeloiden Stammreihe wohl lediglich sekundär durch CpG-induzierte Zytokine aktiviert würden. Eine direkte Stimulation erschien jedoch für diese Subpopulationen unwahrscheinlich [Hartmann, 1999a; Hartmann, 1999b]. Für primäre DCs des peripheren Blutes stellte eine CpG-Zugabe jedoch einen äußerst starken Aktivierungsstimulus dar, der die Zellen zur Ausreifung brachte, sie ohne weiteren Zytokinzusatz *in vitro* am Leben erhielt und ferner zu potenten Stimulatoren allogener T-Zellen machte [Hartmann, 1999b]. Weitere Untersuchungen ergaben jedoch, dass lediglich die CD11c-negative Fraktion primärer DCs des peripheren Blutes direkt auf CpG-Stimulation reagierte [Bauer, 2001a; Kadowaki, 2001a; Krug, 2001b], die CD11c-positive Fraktion, die sogenannten MDCs, jedoch nur sekundär aktiviert wurde. Diese DC-Fraktion stellte sich als identisch mit der oben beschrieben PDC des peripheren Blutes heraus [Cella, 1999; Siegal, 1999]. Es zeigte sich, dass durch bestimmte CpG-ODNs so große Mengen IFN Typ I in PDCs induziert werden können, wie sie sonst nur bei Virusinfektionen vorkommen [Krug, 2001a]. Überdies lässt sich durch Kombination von CpG-DNA und CD40 Ligation eine synergistische Produktion von IL-12 in PDCs erreichen [Krug, 2001b].

1.5.4.3. NK-Zellen und T-Zellen

Seit Tokunagas ursprünglicher Beobachtung, dass murine NK-Zellen durch mykobakterielle DNA zu IFN-γ-Synthese und erhöhter lytischer Aktivität angeregt werden, wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, welche diese Ergebnisse für die Maus bestätigten und ferner auf das humane Immunsystem erweiterten [Yamamoto, 1994]. Bis zu Beginn dieser Arbeit wurden NK-Zellen als die einzige lymphozytäre Subpopulation in humanen PBMCs angesehen, die unmittelbar nach CpG-Stimulation dazu in der Lage sind, IFN-γ zu produzieren [Bohle, 1999; Kranzer, 2000]. Obwohl schon früh darauf hingewiesen wurde, dass zumindest im murinen System eine NK-Zell-Aktivierung sekundär durch APC-produzierte Zytokine vermittelt wird [Ballas, 1996; Cowdery, 1996], propagierten neuere Publikationen eine direkte Stimulation von NK-Zellen durch CpG-DNA [Iho, 1999; Verthelyi, 2001; Gursel, 2002a].

Ähnlich kontrovers wird die Aktivierung von T-Zellen in Zusammenhang mit CpG-DNA diskutiert. Erste Versuche, in denen murine T-Zellen *in vitro* als auch *in vivo* untersucht wurden, konnten darlegen, dass T-Zellen durch IFN Typ I, welches von APCs auf CpG-DNA-Stimulation produziert wurde, sekundär aktiviert wurden [Sun, 1998]. Andere Arbeitsgruppen zeigten jedoch, dass aufgereinigte T-Zellen bei Stimulation über den TZR in Abwesenheit von APCs durch CpG direkt aktiviert werden konnten [Bendigs, 1999] und postulierten somit eine kostimulatorische Wirkung von CpG-DNA auf T-Zellen. Dieselbe Arbeitsgruppe reinterpretierte später diese Beobachtungen, wobei sie vermutete, dass dieser Effekt durch Poly-G-Abschnitte im Rückgrat der ODNs vermittelt sei und nicht durch CpG-Motive [Lipford, 2000a; Lipford, 2000b]. Andere Arbeitsgruppen zeigten wiederum eine CpG-Motiv-abhängige Aktivierung von TZR-stimulierten T-Zellen durch ODNs [Iho, 1999].

*1.5.5. Wirkung von CpG-DNA auf subzellulärer Ebene*

Seit Tokunagas Entdeckung der immunstimulatorischen Wirkung von bakterieller DNA und insbesondere seit Arthur Kriegs detaillierter Charakterisierung der hierzu notwendigen CpG-Motive wurden viele Spekulationen angestellt, über welchen Erkennungsmechanismus dieser Effekt vermittelt wird. Obwohl die meisten Zellen CpG-DNA an ihrer Oberfläche binden, stellte sich bald heraus, dass dieser Prozess Sequenz-unabhängig stattfindet [Zhao, 1994]. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass CpG-DNA nur nach intrazellulärer Aufnahme in endosomale Kompartimente und nach folgender Azidifizierung seine Wirkung entfalten kann [Yi,

1998b]. Immobilisierte CpG-ODNs [Manzel, 1998] zeigen daher keine Wirkung und Chloroquin als Inhibitor der endosomalen Azidifizierung [Macfarlane, 1998] blockiert ebenfalls den CpG-Effekt. Die Suche nach dem genauen Erkennungsmechanismus blieb jedoch lange erfolglos. Erste Hinweise, die zu der Identifizierung des mutmaßlichen „CpG-Rezeptors“ führten, kamen schließlich durch Untersuchungen der durch CpG-Stimulation implementierten Signaltransduktionskaskade. Die durch CpG-Stimulation von murinen Makrophagen induzierte Gen-Expression zeigte eine deutliche Analogie zu dem durch LPS via NF-κB und Stress-Kinasen vermitteltem Muster [Sparwasser, 1997; Hacker, 1998]. Wenig später gelang es schließlich nachzuweisen, dass CpG-DNA über MyD88 und TRAF6 signalisiert, so dass ein Rezeptor aus der *Toll-like*-Familie als „CpG-Erkennungsstruktur“ immer wahrscheinlicher wurde [Hacker, 2000]. Hemmi und Mitarbeiter identifizierten letztlich anhand der Analyse von verschiedenen TLR-*Knock-out*-Mäusen die Expression von TLR9 als notwendige Voraussetzung für die Erkennung von CpG-DNA [Hemmi, 2000]. Diese Beobachtung konnte für das humane System bestätigt werden und ferner konnte auch gezeigt werden, dass eine Expression von TLR9 nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend ist, um CpG-Motive zu erkennen [Bauer, 2001b]. Im Einklang mit den oben beschriebenen Beobachtungen der endosomalen Aufnahme und Reifung als Voraussetzung der CpG-Erkennung konnte außerdem dargestellt werden, dass sich TLR9 in diese Kompartimente lokalisiert [Ahmad-Nejad, 2002].

### *1.5.6. CpG-Oligodesoxynukleotide im therapeutischen Einsatz*

CpG-ODNs stellen aus mehreren Gründen ein attraktives Immunstimulans für den klinischen Einsatz dar:

(1) CpG-ODNs führen im Gegensatz zu einzelnen Zytokinen wie etwa IFN-α oder IL-1 durch ihren Wirkungsmechanismus zu einer koordinierten Immunreaktion, die der natürlichen Situation näher kommt.

(2) Die selektive Aktivierung professioneller APCs und die damit verbundene Förderung einer Antikörperproduktion und zellulären Immunantwort machen CpG-ODNs zu einem geeigneten Adjuvans sowohl bei prophylaktischen als auch bei therapeutischen Impfungen.

(3) Die Induktion einer TH1-Antwort mit Produktion von IFN-γ wehrt Infektionen mit intrazellulären Erregern ab und wirkt allergischen Reaktionen entgegen, die auf dem *switch* einer TH1- zu einer TH2-gerichteten Immunlage basieren.

(4) Die CpG-vermittelte Stimulation des angeborenen Immunsystems und der TH1-Immunlage unterstützt die immunologische Abwehr von Tumorzellen.

#### 1.5.6.1. Übertragung auf das Immunsystem des Menschen

Die Wirkung von CpG-DNA bei der Maus ist eingehend untersucht worden und hat wie oben beschrieben herausragende Ergebnisse in der therapeutischen Applikation bei Infektionen, Allergien und Tumoren ergeben. Es hat sich jedoch in Studien gezeigt, dass die in der Maus aktiven CpG-ODNs nur eine schwache Wirkung auf das humane Immunsystem aufweisen. Ein entscheidender Schritt in Richtung klinische Anwendung von CpG-DNA war somit die Identifizierung eines optimalen humanen CpG-Motivs durch Hartmann et al. mit dem Hexamer 5' GTCGTT 3' [Hartmann, 2000a]. Die Hypothese der Speziesspezifität des optimalen CpG-Motivs wurde in Experimenten bestätigt, in denen TLR9-exprimierende Zelllinien auf Aktivierung durch unterschiedliche CpG-Motive untersucht wurden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Zelllinien, die mit dem humanen TLR9 ausgestattet waren, maximal durch das oben beschriebene Hexamer aktiviert wurden, während hingegen der murine TLR9 eine Präferenz für das Motiv 5' GACGTT 3' aufwies [Bauer, 2001b].

Ausgehend von diesen Untersuchungen ist somit ein „Bauplan" gegeben, der es ermöglicht, optimale Oligonukleotide zu entwerfen, die als gut definierte synthetische Substanzen den bakteriellen Lysaten herstellungstechnisch und auch therapeutisch überlegen sind. Da unmodifizierte ODNs durch Nukleasen rasch abgebaut werden, wird für die Herstellung von CpG-ODNs meist eine chemische Modifikation, die sogenannte Phosphorothioat-Modifikation, verwendet. Hierbei wird ein nicht an der Bindung beteiligtes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom ersetzt. Dies macht die Bindung resistent gegen den Abbau durch Nukleasen und verlängert somit stark die Halbwertszeit *in vivo* [Eckstein 1985].

#### 1.5.6.2. Die Existenz zweier verschiedener CpG-Klassen

Neben den beobachteten Speziesunterschieden in der Erkennung von CpG-Motiven, zeigte sich weiterhin, dass im humanen System nicht nur ein Unterschied in der Quantität der CpG-vermittelten Immunantwort zu beobachten war, sondern auch ein qualitativer Unterschied in der induzierten Immunantwort. Auf Grund dieser Beobachtungen wurde die Existenz von mindestens zwei verschiedenen Klassen von

CpG-ODNs postuliert, die CpG-A und CpG-B genannt wurden [Krieg 2002]. Die Einteilung in diese Klassen folgte primär den Beobachtungen unterschiedlicher biologischer Wirkprofile und nicht spezifischer struktureller Eigenschaften, wobei sich jedoch typische Struktureigenschaften formulieren lassen. CpG-A induziert große Mengen IFN-$\alpha$ in PDCs [Kadowaki, 2001a; Krug, 2001a], wobei CpG-B einen starken Stimulus für B-Zellen darstellt [Krieg, 1995; Hartmann, 2000b], jedoch lediglich geringe Mengen IFN-$\alpha$/ $\beta$ in PDCs induziert [Krug, 2001a]. Eine ähnliche Einteilung wurde von Klinman et al. vorgeschlagen, wobei CpG-A mit dem sogenannten D-Typ ODN und CpG-B mit dem K-Typ ODN korrespondiert. Diese Einteilung beruht jedoch auf der IFN-$\gamma$-Produktion von NK-Zellen, der IL-6-Produktion von Monozyten und der IgM-Synthese von B-Zellen [Verthelyi, 2001; Gursel, 2002a]. Ferner werden zu letzterer Einteilung strukturelle Eigenschaften herangezogen, die sich auf ODN-Rückgrat, CpG-Motiv als auch Vorhandensein von Poly-G-Motiven beziehen. Eine Zusammenfassung der Charakterisitika der CpG-ODN-Klasseneinteilung zeigt Tabelle 3.

| | CpG-A | CpG-B |
|---|---|---|
| primäre Zielzelle | PDC | B-Zelle |
| Prototyp | ODN 2216 | ODN 2006 |
| strukturelle Charakteristika | • chimäres Phosphodiester-/ Phosphorothioat-Rückgrat<br>• Poly-G-Enden<br>• zentrales Palindrom mit CG-Dinkleotid | • vollständiges Phosphorothioat-Rückgrat<br>• enthält das „optimale“ humane CpG-Motiv GTCGTT |
| funktionelle Charakterisitka | • induziert große Mengen IFN Typ I in PDCs<br>• schwache Aktivierung von B-Zellen | • starke Aktivierung von B-Zellen<br>• induziert geringe Mengen IFN Typ I in PDCs |

**Tabelle 3 Die Charakteristika der humanen CpG-Klassen**

1.5.6.3. Untersuchungen an Primaten

Die Wirksamkeit und Sicherheit von CpG-DNA als Vakzine-Adjuvans wurde in einer Reihe von Studien an verschiedenen Primaten bestätigt. Schimpansen wurden mit der herkömmlichen Hepatitis-B Vakzine Engerix B mit und ohne Koinjektion von CpG-ODNs geimpft. Im Gegensatz zu den nur mit Engerix B geimpften Schimpansen führte die Koinjektion von CpG-ODNs schon nach einer einmaligen Impfung zu protektiven Antikörpertitern [Hartmann, 2000b]. Orang-Utans lassen sich mit einer

herkömmlichen Vakzine gegen Hepatitis B nicht immunisieren. Der Zusatz von CpG-ODNs führte im Rahmen eines Not-Impfprogramms, das wegen einer Hepatitis-B Epidemie in Indonesien durchgeführt wurde, bei den mehr als hundert bislang geimpften Orang Utans zu einem schnellen und kompletten Impfschutz [Davis, 2000]. Diese ermutigenden Ergebnisse gaben Anstoß für klinische Studien, in denen CpG-DNA als Adjuvans für die herkömmliche Hepatitis-B Impfung beim Menschen eingesetzt wurde: Die Zwischenanalyse einer Studie mit 56 Probanden konnte tatsächlich bestätigen, dass durch den adjuvanten Einsatz von CpG-DNA rascher höhere protektive Antikörpertiter erreicht wurden. In ähnlichen Impfstudien konnten auch immunsupprimierte Patienten erfolgreich mit diesem Impfstoff behandelt werden und so in 89 % ein ausreichender Impfschutz erzielt werden [Schetter 2003].
Große Hoffnungen werden in die Applikation von CpG-DNA insbesondere im Rahmen einer therapeutischen Vakzine gesetzt. Der für diese Arbeit relevante klinische Ansatzpunkt ist die Immuntherapie maligner Tumoren. An diesem Beispiel soll kurz auf die verschiedenen potenziellen Einsatzmöglichkeiten von CpG-DNA eingegangen werden:

#### 1.5.6.4. CpG-DNA in der Immuntherapie von Tumoren

*CpG-DNA als Monotherapie*

Wie weiter oben beschrieben wird der anti-Tumor Effekt von Infektionen schon seit hunderten von Jahren beobachtet, Hinweis darauf, dass die unspezifische Aktivierung des Immunsystems durch Pathogene zu der Bekämpfung von Tumoren beitragen kann. Dies ist in Einklang mit der Renaissance der Hypothese, dass eine protektive Immunüberwachung, vermittelt insbesondere durch IFN-γ und aktivierte Lymphozyten, das Wachstum maligner Tumoren verhindern kann [Shankaran, 2001]. Durch Aktivierung von Lymphozyten und Induktion von IFN-γ, könnte CpG-DNA zu einer Aktivierung der angeborenen Immunität beitragen und so die endogenen Mechanismen der Immunüberwachung fördern. Diese Hypothese wurde in mehreren Mausversuchen bestätigt, in denen eine prophylaktische CpG-ODN-Gabe sowohl spontane [Wickstrom 1997] als auch induzierte Neoplasien [Dow, 1999] stark verminderte oder sogar verhinderte. Aber auch zahlreiche Studien, in denen eine therapeutische CpG-Applikation nach manifestem Tumorbefall verschiedener Stadien durchgeführt wurde, konnten eine deutliche Regression des Tumorwachstums, wenn nicht sogar eine komplette Remission zeigen [Carpentier, 1999; Dow, 1999]. In manchen Modellen

ließ sich sogar nachweisen, dass ein erneuter Tumorbefall nach erfolgreicher Erradikation eines induzierten Tumors durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses verhindert werden konnte [Carpentier, 2000; Heckelsmiller, 2002b]. Eine entscheidende Rolle in der möglichen Ausbildung einer adaptiven Immunität scheinen hierbei einerseits die Art des Tumors und andererseits die Applikationsform und Art der CpG-DNA zu spielen [Ballas, 2001].
Die Monotherapie maligner Tumoren mit CpG-DNA befindet sich zurzeit in Phase I/ II Studien in klinischer Erprobung.

*CpG-DNA in Kombination mit Antikörpern*

Zurzeit werden mehr als 70 humanisierte monoklonale Antikörper gegen Tumorantigene in klinischen Studien untersucht, wobei Rituximab, Herceptin und auch Alemtuzumab schon für den klinischen Gebrauch zugelassen sind. Ein Haupteffekt monoklonaler Antikörper gegen Tumorantigene wird auf den oben beschriebenen Mechanismus der ADCC zurückgeführt. Hierbei wird eine Tumorzelle durch einen spezifischen Antikörper gebunden, welcher wiederum durch seinen Fc-Teil von einer Fc-Rezeptor-tragenden Zelle, meist NK-Zellen und Neutrophilen, erkannt wird. Die Fc-Rezeptor-tragende Zelle wird durch den Bindungsprozess so aktiviert, dass es zu einer Lyse der Antikörper-gebundenen Zielzelle kommt. Im Mausversuch konnte nachgewiesen werden, dass dieser Prozess der ADCC durch CpG-Applikation stark gefördert wurde und somit in Therapieansätzen mit monoklonalen Antikörpern einen deutlichen Synergismus zeigte [Wooldridge, 1997]. Neben einer Maximierung der ADCC wird bei manchen Neoplasien auch zusätzlich eine verstärkte Expression des Zielantigens durch CpG-Applikation erreicht. So wird z.B. auf primären malignen B-Zellen verschiedener Histologien eine deutliche Expressionssteigerung von CD20 beobachtet, dem Zielantigen von Rituximab [Jahrsdorfer, 2001]. Derzeit laufen mehrere Phase I/ II-Studien, die die Kombinationstherapie von CpG-ODNs und monoklonalen Antikörpern untersuchen [Schetter 2003].

*CpG-DNA als Adjuvans einer Tumorvakzine*

Der erste Hinweis, dass CpG-DNA möglicherweise ein potentes Adjuvans in einer Antigen-spezifischen Immuntherapie von Tumoren darstellt, war eine Zufallsentdeckung. 1996 beobachteten Sun und Mitarbeiter, dass Drosophilazellen,

welche ein MHC-I-restringiertes Antigen präsentierten, eine starke Antigen-spezifische Immunantwort gegen Tumoren induzieren konnten [Sun, 1996]. Nähere Untersuchungen zeigten, dass aus Drosophilazellen freigesetzte DNA für diesen starken Effekt verantwortlich war und, dass CpG-Motive in dieser DNA unabdingbar für den stimulatorischen Effekt waren.

Seitdem wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, die im Maussystem gezielt CpG-DNA als Adjuvans einer Tumorvakzine untersucht haben. Hierbei erwies sich die Anwendung von CpG-DNA in sowohl prophylaktischen als auch therapeutischen Impfstrategien als wirksames Adjuvans in der Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort. CpG-DNA wurde als Adjuvans mit unterschiedlicher Formulierung des Antigens (Tumorpeptide, Tumorproteine und ganze Tumorzellen [Brunner, 2000]) in sowohl *in vivo*- [Heckelsmiller, 2002a; Heckelsmiller, 2002b] als auch *ex vivo*-Ansätzen [Brunner, 2000] erfolgreich getestet. Die durch CpG-DNA aktivierten DCs schaffen in sekundären lymphoiden Organen eine TH1-gerichtete Chemokin- und Zytokinumgebung, die eine effektive Cross-Präsentation von Antigenen fördert und somit eine starke Antwort IFN-γ-produzierender zytotoxischer T-Zellen induziert. Im Rahmen von DNA-Vakzinierungsstudien hat sich der Einsatz von CpG-Motiven als besonders vorteilhaft erwiesen, da hier CpG-DNA die fehlende CD4-T-Zell-Hilfe für ein effektives CTL-Priming ersetzten kann. Untersuchungen an Mäusen haben in der Tat gezeigt, dass der adjuvante Einsatz von CpG-DNA bei Vakzinierung stärkere TH1-Antworten hervorruft als der klassische Goldstandard komplettes Freundsches Adjuvans [Kim, 1999].

## 1.6. Fragestellung

Bakterielle DNA stellt für das angeborene Immunsystem ein potentes Gefahrensignal dar und ist in der Lage, eine effektive adaptive Immunantwort gegen ein gleichzeitig wahrgenommenes Antigen zu induzieren. Sogenannte CpG-Motive innerhalb bakterieller DNA sind die Grundlage für die Erkennung durch das Immunsystem. In Form synthetischer, CpG-Motiv-haltiger ODNs lässt sich die immunstimulatorische Wirkung bakterieller DNA nachahmen. Dies eröffnet die interessante Anwendungsmöglichkeit solcher ODNs als Adjuvans einer therapeutischen Vakzine. Es besteht die Hoffnung, in nicht allzu ferner Zukunft CpG-Motiv-haltige ODNs in der Immuntherapie maligner Tumoren einzusetzen. Erste Versuche im murinen System zeigen vielversprechende Ergebnisse. Allerdings hat die Medizingeschichte speziell im

Bereich Immuntherapie von Tumoren gelehrt, dass sich Tierversuche nur bedingt auf das humane System übertragen lassen.

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit wurde insbesondere für das humane System der genaue Wirkungsmechanismus CpG-Motiv-haltiger DNA auf Effektorzellen der angeborenen Immunität und auf die Induktion einer adaptiven Immunantwort äußerst kontrovers diskutiert. Ein genaues Wissen über primäre Zielzellen und eine Abgrenzung sekundärer indirekter Effekte ist jedoch entscheidend für das mechanistische Verständnis und die konsekutive rationale Entwicklung einer erfolgreichen Immuntherapie. Die Analyse der Mechanismen einer CpG-vermittelten Immunstimulation war lange nicht möglich, da wenig zu dem genauen Erkennungsmechanismus von CpG-DNA bekannt war. Erst seit der Beobachtung, dass die Expression von TLR9 notwendig ist, um CpG-DNA zu erkennen [Hemmi, 2000], ist es möglich, gezielt CpG-sensitive Zellpopulationen zu identifizieren und auf ihre biologische Antwort hin zu untersuchen.

Gegenstand vorliegender Arbeit war somit zunächst, durch genaue Analyse der TLR-Expression in humanen Immunzellen diejenigen Zellen zu identifizieren, die direkt durch CpG-Motiv-haltige DNA aktiviert werden. Anhand dieses Wissens sollte weiterhin die Wirkung immunstimulatorischer DNA auf Effektorzellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort im humanen System genauer charakterisiert werden. Dabei sollte versucht werden, in geeigneten *in vitro*-Modellen folgende Fragestellungen zu beantworten:

(1) Kann durch den Einsatz von CpG-DNA eine zellulär-vermittelte angeborene Immunantwort im humanen System gesteigert werden?
(2) Ist es möglich, eine Antigen-spezifische T-Zell-Immunantwort durch CpG-DNA synergistisch zu verstärken?
(3) Wenn ja, bestehen Unterschiede bezüglich der Induktion einer primären Immunantwort und in der Reaktivierung einer Gedächtnis-T-Zellantwort durch CpG-ODNs?

Bei der Beantwortung dieser Fragen sollte zusätzlich ein möglicher funktioneller Unterschied zwischen den zwei kürzlich beschriebenen Klassen von CpG-ODNs in Betracht gezogen werden. Überdies sollte versucht werden, mögliche Mechanismen eines eventuell vorhandenen kostimulatorischen Effekts einzugrenzen.

# 2. MATERIAL UND METHODEN

## 2.1. Reagenzien, Chemikalien und Geräte

### *2.1.1. Geräte*

| | |
|---|---|
| Begasungsbrutschrank | Fa. Heraeus (Hanau, D) |
| Eismaschine | Fa. Ziegra (Isernhagen, D) |
| ELISA-Reader | Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB) |
| FACSCalibur | Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA) |
| FACStarplus | Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA) |
| Gene Quant RNA/ DNA Calculator | Fa. Pharmacia Biotech (Freiburg, D) |
| Hamilton Spritze | Fa. Hamilton Co. (Reno, Nevada, USA) |
| Kamera Nikon F90X | Fa. Nikon GmbH (Düsseldorf, D) |
| Lamin Air (HB 244 8) | Fa. Heraeus (Hanau, D) |
| Light Cycler | Fa. Roche (Mannheim, D) |
| MidiMACS | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| Mikroskop (Axiovert 25) | Fa. Zeiss (Jena, D) |
| MiniMACS | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| Omnifuge 2 ORS | Fa. Heraeus (Hanau, D) |
| pH-Meter | Fa. WTW (Weilheim, D) |
| Photokammer | Fa. Kodak (Rochester, NY, USA) |
| Power Pac 200 Spannungsgerät | Fa. Biorad (München, D) |
| Scintillation Counter | Fa. Biorad (München, D) |
| Thermocycler Modell T3 | Fa. Biometra (Göttingen, D) |
| Thermocycler RoboCycler Gradient 40 | Fa. Stratagene (Heidelberg, D) |
| Vortex VF2 | Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, CH) |
| Vortexer | Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D) |
| Waage (LP 6209) | Fa. Sartorius (Göttingen, D) |
| Waage (SBC 21) | Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D) |
| Wasser-Deionisierungmaschine | Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D) |
| Zentrifuge (5417 R) | Fa. Eppendorf (Hamburg, D) |

### *2.1.2. Chemikalien*

| | |
|---|---|
| Brefeldin A | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim,D) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA) | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| FACSFlow | Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D) |
| FACSSafe | Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D) |
| Geneticin g-418 Sulfat | Fa. GibcoBRL (Paisley, GB) |
| Heparin-Natrium | Fa. Ratiopharm (Ulm, D) |
| Ortho-mune Lyse-Reagenz | Fa. Ortho-Clinical Diagnostics (Neckarsgmünd, D) |
| To-Pro-3-Iodid (TOPRO-3) | Fa. Molecular Probes (Leiden, NL) |
| Tris-Borat-EDTA (TBE) | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Trypan-Blau | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |

*2.1.3. Radioaktive Chemikalien*

| | |
|---|---|
| $^{51}$Chrom | Fa. Amersham Biosciences (Freiburg, D) |

*2.1.4. Reagenziensätze*

Zellisolation mittels der MACS-Methode:

| | |
|---|---|
| B Cell Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| BDCA-1 Cell Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| BDCA-2 Cell Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| BDCA-4 Cell Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| CD4+ T Cell Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| CD45RO MicroBeads | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| CD8 MicroBeads | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| IFN$\gamma$ Secretion Assay | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| Monocyte Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| NK Cell Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| Pan T Cell Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| TCR$\gamma/\delta$ MicroBead Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |

RNA Isolation, reverse Transkription und PCR:

| | |
|---|---|
| First-Strand cDNA Synthesis Kit | Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D) |
| High Pure RNA Isolation Kit | Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D) |
| LightCycler FastStart DNA Sybr Green I | Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D) |

Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA:

| | |
|---|---|
| human IL-12 p70 ELISA | Fa. Bender Med Systems (Wien, A) |
| human IFN-$\gamma$ ELISA | Fa. Endogen (Boston, USA) |
| human IFN-$\alpha$ ELISA | Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA) |

*2.1.6. Materialien für die Zellkultur*

| | |
|---|---|
| Biocoll Separationsmedium | Fa. Biochrom (Berlin, D) |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | Fa. GibcoBRL (Paisley, GB) |
| Fötales Kälberserum (FCS) | Fa. GibcoBRL (Paisley, GB) |
| Humanes AB-Serum | Fa. BioWhittaker (Wakersville, USA) |
| Humanes Serum-Albumin (HSA) | Fa. Pharmacia & Upjohn (Erlangen, D) |
| *Iscove's modified Dulbecco's medium* (IMDM) | Fa. PAA (Linz, A) |
| L-Glutamin | Fa. PAA (Linz, A) |
| *Phosphate-buffered saline* (PBS) | Fa. PAA (Linz, A) |
| Penicillin | Fa. PAA (Linz, A) |
| *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 Medium | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Streptomycin | Fa. PAA (Linz, A) |

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen, D), Falcon (Heidelberg, D), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterrilin (Stone, Staffordshire, GB) und Corning (Corning, USA) bezogen.

*2.1.7. Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzien*

| | |
|---|---|
| Calcium-Ionomycin | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GMCSF) | Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D) |
| Interferon-β | Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA) |
| Interferon-α2a | Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA) |
| Interleukin-2 | Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D) |
| Interleukin-4 | Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D) |
| Interleukin-7 | Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D) |
| Interleukin-12 | Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D) |
| Interleukin-15 | Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D) |
| Lipopolysaccharid (LPS) (Herkunft: Salmonella typhimurium) | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Phytohämagglutinin (PHA) | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |

*2.1.8. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen*

Folgende Medien und Puffer wurden für die Zellkultur verwendet:

RPMI-Vollmedium:
100 IU/ ml Penicillin
100 µg/ ml Streptomycin
1,5 mM L-Glutamin
10 Vol % FCS
in RPMI 1640-Medium

IMDM-Vollmedium:
100 IU/ ml Penicillin
100 µg/ ml Streptomycin
1,5 mM L-Glutamin
2 Vol % humanes A/ B-Serum
in IMDM-Medium

MACS-Puffer:
2 mM EDTA
0,5 Vol % BSA
pH 7,2
in PBS

Erythrozyten-Lysepuffer:
Ortho-mune Lysereagenz
in PBS

Kryo-Medium:
50 Vol % IMDM-Vollmedium
40 Vol % Humanes AB-Serum
10 Vol % DMSO

TE-Puffer:
10 mM Tris Chlorid
1 mM EDTA
pH 8,0
in Wasser

Lösungen für molekularbiologische Methoden:

Lyse-/ Bindepuffer:
4,5 M Guanidiniumchlorid
50 mM Tris-HCl
30 Vol % Triton X-100
pH 6,6
in Wasser

DNase Inkubationspuffer:
1 M NaCL
20 mM Tris-HCl
10 mM $MnCl_2$
pH 7,0
in Wasser

Waschpuffer I:
5 M Guanidiniumchlorid
20 mM Tris-HCl
60 Vol % Ethanol
pH 6,6
in Wasser

Waschpuffer II:
20 mM NaCl
2 mM Tris-HCl
80 Vol % Ethanol
pH 7,5
in Wasser

Elutionspuffer:
Nuclease-freies
steriles Wasser

TBE-Puffer:
89 mM Tris-Borat
2 mM EDTA
pH 8,3
in Wasser

*2.1.9. Antikörper und tetramere MHC-I-Komplexe*

Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper:

| Bezeichnung | Spezifität | Klon | Herkunft |
|---|---|---|---|
| Anti BDCA-2 | BDCA-2 | AC144 | Miltenyi Biotec |
| Anti BDCA-4 | BDCA-4 | AD5-17F6 | Miltenyi Biotec |
| Anti CD3 | CD3 | UCHT19 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD4 | CD4 | RPA-T8 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD8 | CD8 | G42-8 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD11c | CD11c | B-ly6 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD14 | CD14 | 3E2 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD19 | CD19 | HIB19 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD40 | CD40 | 5C3 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD45RA | CD45RA | HI100 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD45RO | CD45RO | UCHL1 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD56 | CD56 | B159 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD69 | CD69 | FN50 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD80 | CD80 | L307.4 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD83 | CD83 | HB15e | BD/ Pharmingen |
| Anti CD86 | CD86 | IT2.2 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD123 | CDw123 | 7G3 | BD/ Pharmingen |
| Anti HLA-A2 | HLA-A0201 | Poly | P. Fisch |
| Anti HLA-DR | HLA-DR | L243 | BD/ Pharmingen |
| Anti IFN-$\gamma$ | IFN-$\gamma$ | 25723.11 | BD/ Pharmingen |
| Anti IFN-$\alpha$ | IFN-$\alpha$ | Poly | PBL |
| Anti IFN-$\beta$ | IFN-$\beta$ | Poly | PBL |
| Anti IFNR | IFN-Rezeptor | Poly | PBL |
| Anti IL-4 | IL-4 | 8D4-8 | BD/ Pharmingen |
| Anti IL-12 | IL-12 p40+p70 | C8.6 | BD/ Pharmingen |
| Anti IL-15 | IL-15 | 247 NA | R&D Systems |
| Anti Perforin | Perforin | $\delta$G9 | BD/ Pharmingen |
| Anti SLAM | SLAM | A12 | L. Lanier |
| Anti TNF-$\alpha$ | TNF-$\alpha$ | mAb11 | Endogen |
| Anti V$\gamma$9 | V$\gamma$9 | Immu360 | Immunotech |

Folgende tetramere MHC-I-Komplexe (Tetramere) wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

| Bezeichnung | Peptid-Sequenz (N → C) | HLA-Typ | Herkunft |
|---|---|---|---|
| Melan-$A_{26–35}$ A27L | ELAGIGILTV | HLA-A2 | P. Guillaume |
| Flu-$MA_{58–66}$ | GILGFVFTL | HLA-A2 | P. Guillaume |
| HIV $Pol_{476–484}$ | ILKEPVHGV | HLA-A2 | P. Guillaume |

*2.1.10. Oligodesoxynukleotide*

Komplett oder teilweise Phosphorothioat-modifizierte ODNs wurden freundlicherweise von Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, USA) zur Verfügung gestellt. Kleine Buchstaben stehen für Verknüpfung durch Phosphorothioate, große Buchstaben für Verknüpfung durch Phosphodiester am 3´-Ende der Base. Fett gedruckt sind die jeweiligen CpG-Dinukleotide:

| Bezeichnung | Nukleotid-Sequenz (5' → 3') | Referenz |
|---|---|---|
| ODN 2006 | t**cg**t**cg**ttttgt**cg**ttttgt**cg**tt | [Hartmann, 2000a] |
| ODN 2137: | t**gc**t**gc**ttttgt**gc**ttttgt**gc**tt | [Hartmann, 2000a] |
| ODN 1585 | ggGGTCAA**CG**TTGAgggggG | [Ballas, 1996] |
| ODN 2216 | ggGGGA**CG**AT**CG**TCgggggG | [Krug, 2001a] |
| ODN 2243 | ggGGGA**GC**AT**GC**TCgggggG | [Krug, 2001a] |

*2.1.11. Peptide*

Die HLA-A*0201-restringierten Peptide wurden mit einem *Multiple Peptide Synthesizer* (Peptide Synthesizer 433A; Applied Biosystems, Foster City, USA) durch die *core facility* des GSF Forschungszentrums München (Dr. Arnolds, München, D) synthetisiert. Die Reinheit der Peptide übertraf 90 %, wie durch eine anschließende HPLC-Analyse validiert wurde. Die lyophilisierten Peptide wurden bis zu ihrem Einsatz in 30 % DMSO-Lösung bei - 20 °C aufbewahrt.

| Bezeichnung | Peptid-Sequenz (N → C) | Referenz |
|---|---|---|
| Melan-$A_{26–35}$ A27L | ELAGIGILTV | [Valmori, 1998] |
| Flu-$MA_{58–66}$ | GILGFVFTL | [Gotch, 1987] |
| HIV $Pol_{476–484}$ | ILKEPVHGV | [Ogg, 1998] |

*2.1.12. Primer für die real-time-PCR*

Alle Primer-Paare, die in der *real-time*-PCR eingesetzt wurden, wurden freundlicherweise von der Fa. Search-LC (Heidelberg, D) zur Verfügung gestellt. Die Charakteristika der TLR-Primer sind in nachfolgender Tabelle detailliert wiedergegeben.

| Zielgen | *Accession code* | Position des Amplikons | Ampli-fikations-effizienz | Genomische DNA (5 ng/ ml) | Transkripte/ $2 * 10^6$ PBMCs | Transkripte/ 300 HEK 293 Zellen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TLR1 | NM_003263 | 1919–2254 | 1.86 | 886 | 415,704 | 1 |
| TLR2 | NM_003264 | 1549–1819 | 1.90 | 864 | 323,971 | 10 |
| TLR3 | NM_003265 | 1505–1717 | 1.93 | 858 | 16,134 | 12 |
| TLR4 | NM_003266 | 439–767 | 1.91 | 1130 | 317,530 | 0 |
| TLR5 | U88881 | 733–982 | 1.93 | 695 | 37,757 | 22 |
| TLR6 | NM_003268 | 2378–2650 | 1.93 | 1791 | 117,269 | 4 |
| TLR7 | AF245702 | 774–1012 | 1.98 | 563 | 23,972 | 0 |
| TLR8 | AF245703 | 2296–2590 | 1.95 | 831 | 60,790 | 0 |
| TLR9 | AF245704 | 2741–2941 | 1.95 | 853 | 66,799 | 2 |
| TLR10 | AF296673 | 1767–2054 | 1.90 | 785 | 53,267 | 0 |

### *2.1.13. Zelllinien*

Folgende Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

| Zelllinie | Zellart | Herkunft | Referenz |
|---|---|---|---|
| T2 | Humane lymphoblastoide Zelllinie, positiv für HLA-A2 | *American Type Culture Collection* (ATCC) | [Salter, 1985] |
| Raji | Humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie, negativ für MHC-I | ATCC | [Ohsugi, 1980] |
| K562 | Humane Erytroblasten-Leukämie-Zelllinie, negativ für MHC-I | ATCC | [Lozzio, 1975] |
| Daudi | Humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie, negativ für MHC-I | Fisch, P (Freiburg, D) | [Ohsugi, 1980] |

## 2.2. Zellulär-immunologische Methoden

### *2.2.1. Zellkultur*

#### 2.2.1.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 %igen $CO_2$/ Luftgemisch. Sämtliche Experimente und Manipulationen mit Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

#### 2.2.1.2. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblauausschlusstest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, tote Zellen werden blau

angefärbt. Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

#### 2.2.1.3. Bestrahlung von Stimulatorzellen

Zur Verhinderung von Zellteilungen in Stimulatorzellpopulationen wurden die jeweiligen Zellen in 2 - 3 ml Medium aufgenommen und mit 30 Gray in einer Röntgenbestrahlungsanlage (Institut für Immunologie, LMU München, D) bestrahlt.

#### 2.2.1.4. Kultivierung von Tumorzelllinien

Die Tumorzelllinien wurden in 25 - 75 ml Kulturflaschen in RPMI-Vollmedium mit FCS kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder mikrobieller Verunreinigung inspiziert. Das Medium wurde, dem Tumorzell-Wachstum entsprechend, alle zwei bis drei Tage dekantiert und durch frisches Medium substituiert. In sämtlichen Zelllinien wurde eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen ausgeschlossen.

#### 2.2.1.5. Kultivierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Aufgereinigte Zellpopulationen bzw. PBMCs wurden in 96-Well Rundboden-Platten in RPMI-Vollmedium mit 10 % FCS kultiviert. In einigen Versuchen wurden aufgereinigte Zellpopulationen mit PBMCs so kokultiviert, dass ein direkter Zell-Zellkontakt ausgeschlossen werden konnte. Hierzu wurden die zwei Populationen, getrennt durch eine Transwell-Membran, die nur den Austausch löslicher Faktoren gestattet, in 24-Well Flachboden-Platten in Kultur genommen.

In den Versuchen, in denen Peptid-spezifische $\alpha\beta$ T-Zellen generiert wurden, wurden jeweils 3 Mio. PBMCs mit 1 Mio. CD8+ T-Zellen kokultiviert. Hierzu wurde IMDM-Vollmedium mit 2 % humanem A/ B-Serum in 24-Well Flachboden-Platten verwendet. Die Zellkonzentration wurde, falls nicht anders angegeben, stets auf 2 Mio. Zellen pro Milliliter eingestellt.

*2.2.2. Durchflusszytometrie*

2.2.2.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie mittels eines *Fluorescence-activated cell sorter*s (FACS) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand ihres Phänotyps zu unterscheiden und zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ein entsprechendes Oberflächenantigen markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom hintereinander einzeln durch einen Laserstrahl geführt.

Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile führen zu einer Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht) gesammelt und photometrisch detektiert wird. Das Vorwärtsstreulicht wird wesentlich durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Die gewünschte Zellpopulation wird anhand dieser Kriterien ausgewählt und weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Der Laserstrahl regt das Chromophor, der für die Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper, zur Emission von Lichtquanten an, die durch eine Linse gesammelt werden. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle. Zu diesen Fähigkeiten der FACS-Analyse kommt beim FACS-Sorter noch die Möglichkeit dazu, die so charakterisierten Zellen einzeln in Tropfen zu verpacken, diese mit einer elektrischen Ladung zu versehen und zwischen Kondensatorplatten abzulenken, so dass Zellen nach ihren Eigenschaften aufgetrennt und in verschiedene Auffanggefäße sortiert werden können.

Bei der direkten Immunfluoreszenz werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, die direkt an Oberflächenmoleküle binden. Bei dem Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz werden die Zellen in einem ersten Schritt mit einem unmarkierten Antikörper inkubiert und erst in einem zweiten Schritt mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gefärbt, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörper gerichtet ist.

Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil

überlappen. Diese Überlappung wird durch Kompensation korrigiert, indem von jedem registrierten Fluoreszenzsignal der Anteil abgezogen wird, der durch Überlappung entsteht. Hierzu werden bei jedem Versuch Kontrollproben hergestellt, bei denen jeweils nur eine Eigenschaft mit einem bestimmten Fluorochrom angefärbt ist, während die anderen Fluorochrome, gebunden an geeignete Isotypen-Antikörper, als Negativkontrolle dienen. Hierbei wird sichtbar, wie stark ein bestimmtes Fluorochrom in die anderen Kanäle hineinstrahlt und ermöglicht so die Kompensation. Ebenso kann mit Hilfe der Isotypen die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle so justiert werden, dass sich Zellen mit entsprechenden Antigenen bzw. Eigenschaften qualitativ und quantitativ unterscheiden und vergleichen lassen.

Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und die dazugehörigen maximalen Emissions- und Exzitations-Wellenlängen:

| Fluoreszenzfarbstoff | Exzitation | Emission |
|---|---|---|
| Fluorescein-Isocyanat (FITC) | 494 nm | 518 nm |
| Phycoerithrin (PE) | 565 nm | 575 nm |
| Propidiumiodid (PI) | 536 nm | 617 nm |
| Allophycocyanin (APC) | 650 nm | 660 nm |
| TOPRO-3 | 642 nm | 661 nm |
| Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP) | 488 nm | 675 nm |

#### 2.2.2.2. Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Für FACS-Analysen wurden 5 x $10^5$ - 3 x $10^6$ Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen im zurücklaufenden Tropfen resuspendiert. Zur Färbung wurden die Zellen daraufhin 15 min bei 4 °C unter Lichtausschluss mit FITC, PE, PerCP oder APC gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) bzw. einem unmarkierten Antikörper (indirekte Fluoreszenz) inkubiert und anschließend mit PBS einmal gewaschen. Bei indirekter Fluoreszenz wurde anschließend der Inkubationsschritt, diesmal mit einem fluoreszenzgekoppeltem Isotyp-spezifischem Antikörper, wiederholt. Wenn nötig wurde PI oder TOPRO-3 zur Anfärbung toter Zellen kurz vor der FACS-Analyse hinzugegeben. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde auf einem FACSCalibur gemessen und anschließend mit Hilfe der Cell Quest Software analysiert.

#### 2.2.2.3. Bestimmung von intrazellulären Molekülen

Zur Messung intrazellulärer Moleküle wurden die Zellen nach der konventionellen Oberflächenfärbung mit 100 µl Paraformaldehyd (Lösung A, *Fix & Perm*-Reagenz) für

15 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 100 µl Saponin-haltiger Lösung (Lösung B, *Fix & Perm*-Reagenz) für 15 min permeabilisiert und der entsprechende Fluoreszenz-Antikörper für die intrazelluläre Messung hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubationsphase von 15 min bei RT wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Die Analyse wurde dann wie oben beschrieben durchgeführt.

#### 2.2.2.4. Proliferationsmessung mittels Durchflusszytometrie

Die Analyse der Proliferation mittels der Durchflusszytometrie gestaltet sich insofern als schwierig, als es nicht möglich ist von dem prozentualen Anteil einer Zellpopulation an der Gesamtheit der Zellen auf eine tatsächliche stattgehabte Proliferation zurückzuschließen. Ein erhöhter prozentualer Anteil einer Zellpopulation kann zwar einerseits einer tatsächliche Proliferation entsprechen, andererseits auch lediglich einen erhöhten Verlust von restlichen Zellen bedeuten und somit eine Proliferation vortäuschen. Eine Abhilfe schafft hier die Proliferationsmessung mittels des Farbstoffes 5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE). CFSE bindet spontan und irreversibel sowohl intrazelluläre als auch oberflächliche Moleküle. Bei jeder Zellteilung wird die gleiche Menge an Farbstoff an beide Tochterzellen weitergegeben, die somit halb so stark fluoreszieren wie die „elterliche“ Zelle. Mit einer geeigneten Oberflächengegenfärbung lassen sich somit gezielt bestimmte Zellpopulationen auf Proliferation untersuchen.

Um eine homogene CFSE-Färbung einer Zellpopulation zu erreichen, wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen: 10 Mio. Zellen wurden in 400 µl PBS mit einer 1 µM CFSE-Konzentration gegeben. Anschließend wurde die Suspension durchmischt, in ein neues Gefäß überführt, um evtl. am Rand haftende, ungefärbte Zellen auszuschließen, und dann für 10 min auf Eis inkubiert. Um die Färbe-Reaktion zu stoppen und das extrazelluläre CFSE zu blocken, wurde dann 2 ml RPMI-Vollmedium hinzugegeben und anschließend mit NaCl zweimal gewaschen.

#### 2.2.2.5. Tetramere MHC-I-Moleküle

Eine erst vor kurzer Zeit entwickelte Methode zur Identifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen ist die sogenannte Teramer-Technik [Altman, 1996]. Hierfür werden mit unterschiedlichen Expressionssystemen lösliche humane

MHC-I-Moleküle generiert. Anschließend werden die Moleküle gereinigt, konzentriert und biotinyliert. Entsprechend ihrer jeweiligen HLA-Subtypenzugehörigkeit werden die synthetisierten MHC-I-Moleküle mit korrespondierenden Peptiden beladen und anschließend mit Streptavidin tetramerisiert. Die so generierten Peptid-beladenen tetrameren MHC-I-Moleküle können mit Fluorochromen markiert werden und anschließend für Analysen am FACS eingesetzt werden. Die Färbung Peptid-spezifischer T-Zellen mit tetrameren MHC-Peptid-Komplexen beruht auf der stabilen Bindung der Tetramere an die entsprechenden TZRs. Wie Untersuchungen gezeigt haben, stellt dieses Verfahren eine äußerst genaue Methode für eine direkte Quantifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen aus peripherem Blut oder gemischten Zellkulturen dar.

### *2.2.3. Aufreinigung von Zellpopulationen*

#### 2.2.3.1. Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Gesunden Spendern wurde 100 ml heparinisiertes Blut abgenommen, wobei pro 10 ml Blut 100 µl Heparin verwendet wurde. Das Blut stand bei Raumtemperatur maximal 2 h, bevor daraus die Fraktion der mononukleären Zellen präpariert wurde.

Hierzu wurde das Blut auf vier Röhrchen à 50 ml verteilt, die zuvor mit je 15 ml Ficoll-Hypaque gefüllt worden waren. Anschließend wurde auf 50 ml mit sterilem, 0,9 % NaCl vorsichtig aufgefüllt, ohne dass sich dabei die drei Phasen vermischten. Nach Zentrifugation (1000 g, 20 °C, 15 min, Beschleunigung 1, Bremsung 1) fand man in jedem Blue Cap von oben nach unten die folgende Schichtung vor: Plasma, Ring aus mononukleären Zellen, Ficoll, Erythrozyten. Der PBMC-Ring wurde vorsichtig abpippetiert, in ein neues Blue Cap gegeben, mit NaCl auf 50 ml aufgefüllt und wiederum zentrifugiert (520 g, 20 °C, 15 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Anschließend folgten zwei weitere Waschschritte, bei denen zunächst der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit 10 ml NaCl resuspendiert und jeweils zwei Suspensionen zusammenpipettiert, erneut auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert wurden (400 g, 4 °C, 10 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Vor dem letzten Waschschritt wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Zuletzt wurde das Zellpellet in dem gewünschten Kulturmedium aufgenommen, die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer und Trypanblaufärbung gezählt und auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Es wurden nur solche mononukleäre Zellfraktionen

weiterverwendet, von denen über 95 % den Supravitalfarbstoff Trypanblau dank intakter Zellmembranen ausschlossen.

#### 2.2.3.2. Aufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung

Bei der *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)-Isolationsmethode werden Zellen mit speziellen Antikörpern markiert, die an paramagnetische Mikropartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt sind. Nachdem die Zellen für 15 min in einem speziellen MACS-Puffer bei 4 °C mit den Microbeads markiert wurden, werden sie gewaschen und anschließend in MACS Puffer resuspendiert. Anschließend wird die markierte Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält. Die Säule wird in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten eingebracht und somit alle mit Microbeads beladenen Zellen in der Matrix zurückgehalten. Alle unmarkierten Zellen werden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt, so dass nur die gewünschte Zellpopulation in der Säule zurückgehalten wird. Anschließend lässt sich die markierte Zellpopulation mit einem Stempel aus der Säule außerhalb des Magnetfelds eluieren. Sowohl die markierte als auch die unmarkierte Zellfraktion lässt sich anschließend in Kultur nehmen. Das MACS-System kann entweder zur Anreicherung (positive Selektion) oder zum Ausschluß einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden.

Zur Aufreinigung nach der MACS-Methode wurden in dieser Arbeit ausschließlich Reagentiensätze der Firma Miltenyi Biotec nach dem entsprechendem Hersteller-Protokoll verwendet.

#### 2.2.3.3. Aufreinigung mit der FACS-Technologie

Für Zellsortierungen wurden unter sterilen Bedingungen 1 - 100 x $10^6$ Zellen mit FACS-Antikörpern markiert, in Medium gewaschen, in 1,5 - 2 ml Medium resuspendiert und zur Entfernung von Zellaggregaten durch eine Nylon-membran mit 100 $\mu$m Poren filtriert. Die Sortierung wurde mit einem FACStar$^{plus}$ an der *sorting-facility* des GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München) mit freundlicher Unterstützung von Dr. Ellwart durchgeführt.

*2.2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay*

Zur Bestimmung verschiedener Proteine im Überstand von Zellkulturen wurde ein ultrasensitiver *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt.
Hierzu werden Zell-freie Kultur-Überstände abgenommen und bei Bedarf entsprechend mit Medium verdünnt. Neben einer Standardreihe mit bekannter Proteinmenge werden nun alle Proben in Wells pipettiert, die mit einem Protein-spezifischen Antikörper beschichtet sind. Während der zwei-stündigen Inkubationszeit bindet das vorhandene Protein an die Antikörper. Nach drei Waschschritten wird nun ein zweiter, biotinylierter Antikörper zugegeben, der das bereits gebundene Protein an einem anderen Epitop bindet. Nach 30 min folgt ein weiterer Waschschritt. Daraufhin wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben, welches an Biotin bindet. Durch Verwendung mehrerer Biotin-Streptavidin-Brücken pro Antikörper, wird eine Signalverstärkung und somit eine höhere Sensitivität erreicht. Nach Entfernung des Konjuagtes durch einen weiteren Waschschritt, gibt man die Substratlösung hinzu, gebundenes Enzym wird nun zu Farbstoff umgesetzt. Die Farbintensität, die proportional zur Protein-Konzentration der Probe ist, wird dann mittels eines ELISA-Readers eingelesen. Durch die Standardreihe besteht die Möglichkeit die genaue, in der Probe enthaltene Konzentration zu errechnen.

*2.2.5. Zellvermittelter Zytotoxizitätstest ($^{51}$Chrom-Lyse-Test)*

Der $^{51}$Chrom-Lyse-Test stellt einen quantiativen Test dar, mit dem die zytotoxische Aktivität von T-Zellen und NK-Zellen (Effektorzellen) gegenüber mit $^{51}$Chrom-markierten Zielzellen ermittelt wird. Dazu werden Zielzellen in $^{51}$Chromat6+ inkubiert, wobei die Zielzellen das $^{51}$Chromat6+ aufnehmen und zu $^{51}$Chromat3+ reduzieren. Das reduzierte $^{51}$Chromat3+ wird nur noch langsam freigesetzt und kann von anderen Zellen nicht aufgenommen werden. Werden die Zielzellen mit den Effektorzellen koinkubiert, wird durch Zytolyse das $^{51}$Chrom aus den Zielzellen in den Überstand freigesetzt und kann in diesem mit Hilfe eines $\gamma$-Zählers gemessen werden. Da sich die Menge des freigesetzten $^{51}$Chroms proportional zu der Zytolyse der Zielzellen verhält, lässt sich ein Rückschluss auf die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen zu.

Zur Durchführung des Tests wurden die Zielzellen in einem 15 ml Teströhrchen abzentrifugiert, in ca. 50 $\mu$l Medium resuspendiert und 1 h bei 37 °C mit $Na_2$ $^{51}CrO_4$ (100 $\mu$Ci/ $10^6$ Zellen) unter gelegentlichem Aufschütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je 10.000 Zielzellen/ Well auf einer 96-Well Rundboden-Platte

ausplattiert und die vorher ebenfalls gewaschenen Effektorzellen, in dem jeweils angegebenen Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen (E:T-Ratio), zu einem Gesamtvolumen von 200 µl dazugegeben. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C, wurden jeweils 50 µl Überstand/ Well in Szinitilationsröhrchen übertragen. In einem γ-Zähler wurde die Radioaktivität des Überstandes in *counts per minutes* (cpm) gemessen. Für jede markierte Zielzelllinie wurde die Spontanfreisetzung von $^{51}$Chrom – durch alleinige Inkubation mit Medium – und die Maximalfreisetzung – durch Zugabe des Detergenz Triton-X – bestimmt. In allen Versuchen wurden biologische Triplikate angefertigt. Alle Lysestests wurden in RPMI Vollmedium mit 10 % FCS durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Computerprogramms. Dabei wurde die Stärke der Zytotoxizität der Effektorzellen in Prozent spezifische Lyse angegeben. Die spezifische Lyse wurde dabei wie folgt berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{Experimentelle } ^{51}\text{Cr -Freisetzung (cpm)} - \text{Spontane } ^{51}\text{Cr -Freisetzung (cpm)}}{\text{Maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung (cpm)} - \text{Spontane } ^{51}\text{Cr -Freisetzung (cpm)}}$$

## 2.3. Molekularbiologische Methoden

### *2.3.1. Extraktion zytoplasmatischer RNA*

Zur Extraktion zytoplasmatischer RNA wurden 1 x $10^5$ - 2 x $10^6$ Zellen in kaltem PBS gewaschen und anschließend in 200 µl PBS resuspendiert. Durch Zugabe von 400 µl eines Lyse-/ Bindepuffers erfolgte die Lyse der Zellen und die gleichzeitige Inaktivierung von RNasen. Die Probe wurde anschließend auf eine Säule mit einem Glasfaservlies gegeben und 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Da nur Nukleinsäuren in dem Glasfaservlies der Säule hängen bleiben, wurde der Durchlauf verworfen. Danach wurde die zurückgebliebene DNA durch Zugabe von 100 µl DNase-Lösung für 15 min bei RT verdaut. Die verdaute DNA und die DNase wurde durch drei Waschschritte aus dem Vlies der Säule entfernt: Erst wurde 500 µl Waschpuffer I hinzugegeben und 15 s bei 8000 g zentrifugiert, dann wurde 500 µl Waschpuffer II hinzugegeben und wiederum 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Schließlich wurde ein letzter Zentrifugationsschritt mit 200 µl Waschpuffer II für 2 min bei 13.000 g durchgeführt. Letztlich konnte die RNA aus dem Glasfaservlies eluiert werden. Hierzu wurde 50 µl Elutionspuffer auf die Säule pippetiert und anschließend die RNA durch eine Zentrifugation für 1 min bei 8000 g aus dem Vlies herausgelöst. Die extrahierte RNA wurde bei –20 °C aufbewahrt.

*2.3.2. Gelelektrophorese*

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde ein 1,5 %ges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 3,0 g Agarose mit 200 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach Zugabe von 7,5 µl Ethidiumbromid, wurde es in die vorgegebene Gelwanne gegossen und 1 h lang bei RT abgekühlt. Durch Einbringen in die Elektrophorese-Kammer wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet. Nach Entfernen des Kammes konnten die DNA-Proben mit fünffachen Ladepuffer in die Geltaschen geladen werden. Der Ladepuffer enthielt einen Farbstoff, der das Einpipettieren erleichterte und Glycerin, welches aufgrund seiner höheren Dichte das rasche Absinken in die Taschen zur Folge hatte. Nun erfolgte das Anlegen eines elektrischen Feldes, welches durch Einstellen der Stromstärke auf 90 - 100 mA und Wahl eines nicht begrenzenden Spannungswertes festgelegt wurde. Da der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in die Nukleotidstränge interkaliert, konnte die Auftrennung der DNA-Fragmente im UV-Licht (366 nm) kontrolliert werden. Somit wurden im Anschluss an die Elektophorese die Gele im UV-Licht mit einer Polaroidsofortbildkamera fotografiert.

*2.3.3. Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Oligonukletoiden*

Die Konzentration von RNA, DNA und Oligonukleotiden wurde mit einem Spektrometer bestimmt. Es wurde meist ein komplettes Absorbtionsspektrum von 220 bis 320 nm der Nukleinsäure-Lösung in $H_2O$ aufgenommen und die optische Dichte beim Absorbtionsmaximum um 260 nm bestimmt. Einer $OD_{260}$ von 1 entspricht dann etwa 50 µg/ ml DNA bzw. 40 µg/ ml RNA bzw. 20 µg/ ml eines Oligonukleotids.

*2.3.4. Reverse Transkription*

Um über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden zu können, musste die RNA revers transkribiert werden und in einen cDNA (*copy*-DNA)-Einzelstrang umgeschrieben werden. Hierzu wurde der *First-Strand cDNA Synthesis Kit* von Roche Diagnostics verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien in der Endkonzentration zusammen: 10 mM Tris, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM *Deoxynucleotide Mix*, 0,04 $A_{260}$ U *Oligo-p(dT)$_{15}$ primer*, 50 U *Rnase Inhibtor* und 20 U *AMV Reverse Transkriptase*.

8,2 µl der gewonnenen RNA wurden mit 11,8 µl des First-Strand Reaktionsmixes für 10 min bei 25 °C inkubiert und anschließend für 60 min auf 42 °C erhitzt. Um eine Interferenz der AMV Reversen Transkriptase mit der folgenden PCR auszuschließen, wurde der Reaktionsansatz am Ende für 5 min auf 99 °C erhitzt um die AMV zu denaturieren. Die gewonnene cDNA wurde durch Zugabe von bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 µl gebracht und die gewonnene cDNA so als Ausgangssubstanz für die PCR verwendet.

### *2.3.5. Polymerase-Kettenreaktion*

#### 2.3.5.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Das Verfahren der PCR ermöglicht es, ein spezifisches DNA-Stück aus einem komplexen Nukelinsäuregemisch (genomische DNA, Plasmid-DNA, cDNA) zu amplifizieren. Diese spezifische, zu amplifizierende DNA-Matrize wird hierbei auch als *template* bezeichnet. Die Reaktion erfolgt mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und einem sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaar, das den Enden des *templates* homolog ist. Die Reaktion durchläuft drei Schritte: 1. Denaturierung und bei doppelsträngiger DNA Aufschmelzen der beiden Stränge der Matrizen-DNA (Denaturierung), 2. Spezifische Hybridisierung der Primer an die homologe Zielsequenz auf der DNA (Anlagerung) und 3. Von den Primern ausgehende DNA-Synthese (Elongation). Das so synthetisierte DNA-Fragment kann in der darauffolgenden Amplifikationsrunde als Matrize für den anderen Primer dienen. Dadurch ist in mehreren aufeinander folgenden Zyklen eine exponenzielle Anreicherung einer beliebigen DNA-Sequenz, die zwischen den beiden Primern liegt, möglich. Für die PCR Reaktion wurde das *LightCycler – FastStart DNA Master SYBR Green I Kit* von Roche Diagnostics nach folgendem Ansatz verwendet:

| Reagenz | Menge | Endkonzentraion |
|---|---|---|
| cDNA | 10 µl | |
| dATP | je 2 µl | 200 µM |
| dGTP | | 200 µM |
| dCTP | | 200 µM |
| dUTP | | 200 µM |
| Polymerase | | 2 U |
| PCR-Puffer | | |
| $MgCl_2$ | | 2 mM |
| SYBR Green I | | |
| Primer *sense* | 1 µl | 0,5 µM |
| Primer *antisense* | 1 µl | 0,5 µM |
| $H_2O$ | 6 µl | |

2.3.5.2. *Hot-start*-Verfahren

Zu Beginn der PCR kommt es, wegen den anfänglich noch niedrigeren Temperaturen, zu unerwünschten Effekten wie Fehlhybridisierung der Primer oder Primerdimerbildung, die im weiteren Verlauf zu einer schlechten Ausbeute oder zu unspezifischen Produkten führen. Mit dem *hot-start*-Verfahren kann man diesem Problem begegnen, indem man die DNA-Polymerase erst hinzufügt, wenn die richtige Arbeitstemperatur erreicht wird. Eine alternative Methode ist es, die Polymerase durch hitzelabile Kofaktoren so zu behindern, so dass sie erst bei deren Denaturierung aktiv wird. Ein solches Verfahren wurde in dieser Arbeit mit dem Einsatz der *FastStart Taq DNA Polymerase* von Roche Diagnostics angewendet. So wurde eine zweiminütige Denaturierungsphase von 95 °C jeder PCR vorgeschaltet, um eine optimale Aktivierung der Polymerase zu erzielen.

2.3.5.3. *Touch-down*-Verfahren

Eine weitere Modifikation der PCR, die eine Fehlhybridisierung der Primer am Anfang der PCR verhindern kann, ist das sogenannte *touch-down*-Verfahren. Da sich Fehlhybridisierungen, die zu einem frühen Zyklus stattfinden, besonders stark in das quantitative Ergebnis einer PCR auswirken, ist es von Vorteil, besonders in der frühen Phase der PCR für eine hohe Spezifität zu sorgen. Dies lässt sich unter anderem dadurch erreichen, dass man eine höhere Primer-Anlagerungstemperatur in der ersten Hälfte der PCR wählt und diese dann schrittweise der optimalen Anlagerungstemperatur der Primer über mehrere Zyklen angleicht. Somit kommt es zwar zu Beginn der Reaktion zu einer geringeren Amplifikation des *templates*, doch wird die Spezifität der PCR hierdurch deutlich verbessert.
In dieser Arbeit wurde die Anlagerungstemperatur initial 10 °C höher als vorgesehen gewählt und dann kontinuierlich in 0,5 °C Schritten in 20 Zyklen auf das eigentliche Primer-Optimum gesenkt.

Die Primer, die in dieser Arbeit benutzt wurden, wurden so konzipiert, dass sie alle in dem gleichen Zyklus-Protokoll eingesetzt werden konnten:

| | Zyklus | Denaturierung | | Anlagerung | | Elongation | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Aktivierung der Polymerase | 0 | 95 °C | 120 s | - | - | - | - |
| *Touch-down*-PCR | 1 - 20 | 95 °C | 1 s | 68 °C * | 10 s | 72 °C | 16 s |
| | 21 - 40 | 95 °C | 1 s | 58 °C | 10 s | 72 °C | 16 s |

* Zyklus 1 - 20: -0,5 °C pro Zyklus

2.3.5.4. *Real-time*-PCR

Die PCR wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um eine quantitative Aussage über die mRNA-Expression bestimmter Proteine treffen zu können. Eine Quantifizierung mittels konventioneller PCR ist jedoch nur möglich, solange sich die PCR-Reaktion im linearen Bereich der Amplifikationseffizienz befindet - d.h. es findet pro Zyklus eine Verdoppelung des entsprechenden *templates* statt. In der Plateauphase der PCR-Reaktion lässt sich jedoch oft ein ursprünglicher Mengenunterschied der entsprechenden DNA-Matrize nicht mehr feststellen. Die Plateauphase wird bei jeder PCR-Reaktion unterschiedlich schnell erreicht und kann deshalb nur sehr schwer überprüft werden. Hierzu müsste man nach jedem PCR-Zyklus ein Aliquot aus der Reaktion entfernen und zur Quantifizierung auf ein Gel auftragen, ohne jedoch die Bedingungen der PCR-Reaktion zu beeinflussen. Diese Überprüfung entfällt jedoch, wenn die gebildetete DNA-Menge während der PCR im Reaktionsansatz gemessen werden kann. Dies ist mit Hilfe der *real-time*-PCR möglich. Vor Beginn der PCR wird zu jeder Probe ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben, der sich nur an doppelsträngige DNA anlagern kann. Nach jeder Elongationsphase werden die Proben, die sich in Glaskapillaren befinden, mit einem Laser angeregt und emittieren so, proportional zur gebildeten DNA-Menge, ein Signal. Das Fluoreszenzsignal wird mit einer entsprechenden Linse gemessen und von einem Computer gespeichert. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität wird dann gegen die Zykluszahl aufgetragen. Mit geeigneten Referenzproben, deren Kopienzahl bekannt ist, lässt sich schließlich auf die ursprüngliche Kopienzahl in der zu untersuchenden Probe zurückschließen. Um letztlich eine quantitative Aussage über die mRNA-Expression eines bestimmten Gens zu erhalten, wird die gemessene Kopienzahl auf die Transkriptzahl eines sogenannten Referenzgens bezogen, welche in jeder Probe zusätzlich bestimmt wird. Das Referenzgen wird hierbei so gewählt, dass dessen Expression nicht durch den Versuchsansatz beeinflusst wird.

Da manche der TLR-Primer auch genomische DNA detektieren, wurde zusätzlich eine Qualitätskontrolle durchgeführt, um die Amplifikationseffizienz der Primerpaare zu vergleichen. Hierzu wurden jeweils 5 ng genomische DNA (entspricht ca. 1500 genomischen Kopien) als *template* eingesetzt und die Kopienzahl nach Amplifikation bestimmt. Die hierbei detektierte Kopienzahl lag mit 561 bis 1791 Transkripten nah an der zu erwartenden Zahl von 1500 Kopien. Nimmt man in Betracht, dass es durch einen PCR-Zyklus zu einer ca. $16 * 10^6$ fachen Vervielfältigung eines *templates* kommt, so demonstrieren diese Werte die Genauigkeit der durchgeführten PCR. Ferner, um

eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurde von zufällig ausgewählten Proben eine sogenannte „minus RT-Probe“ angefertigt. Bei diesen Proben wurde der Umschrieb der mRNA in cDNA unterlassen und anschließend diese Proben als *template* in einer PCR-Reaktion eingesetzt. In keiner dieser Proben kam es zu einer Amplifikation des mutmaßlichen Zielgens, so dass eine Verunreinigung mit genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte. Jede Probe wurde in zwei unabhängigen Ansätzen gemessen und der entsprechende Mittelwert gebildet. Die Kopienzahlen der detektieren Zielgene wurden schließlich auf das Referenzgen Cyclophilin-B normalisiert und als Kopienzahlen pro 1000 Kopien Cyclophilin-B angegeben.

Die Charakterisitka der verwendeten Primer ist unter Absatz 2.1.12. (Primer für die *real-time-PCR*) angegeben.

## 2.4. Statistische Analyse

Bei multiplen Versuchen sind die Ergebnisse als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean*, SEM) dargestellt werden. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde der zweiseitige Student-t-Test für paarige Stichproben parametrischer Verteilungen angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten $< 0,05$ bzw $p < 0,01$ angenommen und ist durch Markierung mit einem * bzw ** angezeigt. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm StatView D-4.5 (Abacus Concepts, CA, USA) durchgeführt. Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint (Microsoft Cooperation, CA, USA).

# 3. ERGEBNISSE

## 3.1. Identifizierung von CpG-reaktiven lymphozytären Zellpopulationen durch Untersuchung der differenziellen TLR-Expression

### *3.1.1. Charakterisierung der Expression von TLR1-10 in PDCs, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen*

Im Jahr 2000 konnten Hemmi und Mitarbeiter nachweisen, dass im murinen System der Transmembranrezeptor TLR9 notwendig ist, um eine immunstimulatorische Wirkung durch CpG-DNA zu vermitteln [Hemmi, 2000]. Diese Ergebnisse ließen sich bald darauf auf das humane System übertragen und konnten durch die Beobachtung erweitert werden, dass die Expression von TLR9 nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend ist um einen CpG-Effekt zu vermitteln [Bauer, 2001b]. Die Expression von TLR9 ist somit ein eindeutig messbares Kriterium, das erfüllt sein muss, damit eine Zellpopulation direkt auf CpG-DNA reagieren kann. Um anhand dieser Eigenschaft diejenigen Zellpopulationen zu identifizieren, die sich direkt durch CpG-DNA aktivieren lassen, wurden aus PBMCs die Hauptzellpopulationen per MACS-Technologie isoliert und die mRNA-Expression der bis dato bekannten TLR-Moleküle in einer quantitativen RT-PCR bestimmt. In Abb. 2 ist die TLR1-10 mRNA-Expression von PDCs, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen in Kopien pro $\mu$l cDNA dargestellt.

Bezogen auf die einzelnen Zellpopulationen ergaben sich hierbei folgende charakteristische TLR-Expressionmuster: Die TLR-Expression in PDCs war auf TLR1, TLR6, TLR7 und TLR9 beschränkt. Von allen TLRs war die Expression von TLR9 am deutlichsten. B-Zellen hingegen, exprimierten ein breites Spektrum an TLRs, welches ebenfalls die Expression von TLR1, TLR6, TLR7 und TLR9 beinhaltete. Im Vergleich zu PDCs war in B-Zellen die Expression von TLR1 und TLR6 stärker, die von TLR9 jedoch schwächer. Zusätzlich ließen sich in B-Zellen hohe Kopienzahlen von TLR10 nachweisen. Monozyten ließen sich durch eine sehr hohe Expression von TLR2 charakterisieren, TLR1, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR8 wurden auf niedrigerem Niveau, jedoch deutlich nachweisbar exprimiert. TLR9 war ebenfalls in Monozyten zu detektieren, allerdings in wesentlich geringerer Menge als in PDCs oder B-Zellen. NK-Zellen exprimierten deutliche Mengen von TLR1 und geringe Mengen von TLR2, TLR3, TLR5 und TLR6. Die TLR-Expression in T-Zellen war allgemein niedrig, wobei

TLR1 und TLR5 die am deutlichsten nachweisbaren TLR-Moleküle waren. Sowohl in NK-Zellen als auch in T-Zellen konnten geringe Mengen TLR9 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Expressionslevel einzelner TLRs bezogen auf die einzelnen Populationen (Abb. 2 horizontaler Vergleich) ergab folgende charakteristische und statistisch signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede: Im Vergleich zu PDCs und T-Zellen war in B-Zellen, Monozyten und NK-Zellen die Expression von TLR1 höher, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen PDCs und T-Zellen bzw. zwischen B-Zellen, Monozyten und NK-Zellen aufgezeigt werden konnten. TLR2 war hauptsächlich in Monozyten nachzuweisen, wurde aber auch in B-Zellen und NK-Zellen gemessen. TLR3 war fast ausschließlich in NK-Zellen vorhanden. TLR4 wurde am höchsten in Monozyten exprimiert, konnte jedoch auch in B-Zellen detektiert werden. TLR5 war nicht in PDCs und B-Zellen nachweisbar, jedoch in geringen Mengen in Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen zu messen. TLR6 wurde am höchsten in B-Zellen exprimiert, konnte aber auch in Monozyten, PDCs und NK-Zellen aufgezeigt werden. Letztere Zellpopulationen exprimierten diesen TLR signifikant höher als T-Zellen. Die Expression von TLR7 zeigte ein dem TLR5 inverses Expressionsmuster; TLR7 war signifikant höher in PDCs und B-Zellen vertreten, während im Vergleich dazu Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen nur marginale Expressionslevel an TLR7 vorwiesen. Ferner zeigte sich, dass die Expression von TLR7 in PDCs signifikant höher war als in B-Zellen. Beachtliche Kopienzahlen von TLR8 wurden lediglich in Monozyten detektiert, wobei jedoch eine statistische Signifikanz zwischen Monozyten und NK-Zellen nicht erreicht wurde ($p=0,06$). Die Verteilung von TLR9 auf die verschiedenen Zellpopulationen war der von TLR7 sehr ähnlich, wobei gleichwohl insgesamt höhere Kopienzahlen erreicht wurden. In Analogie zu TLR7 exprimierten PDCs höhere Level an TLR9 als B-Zellen. Auch zeigten sowohl PDCs als auch B-Zellen eine höhere Expression dieses TLR als Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen, die nur marginale Level an TLR9 exprimierten. TLR10 war fast ausschließlich in B-Zellen zu messen. Lediglich PDCs exprimierten, auf niedrigem Niveau, signifikant höhere Mengen dieses TLRs als Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen.

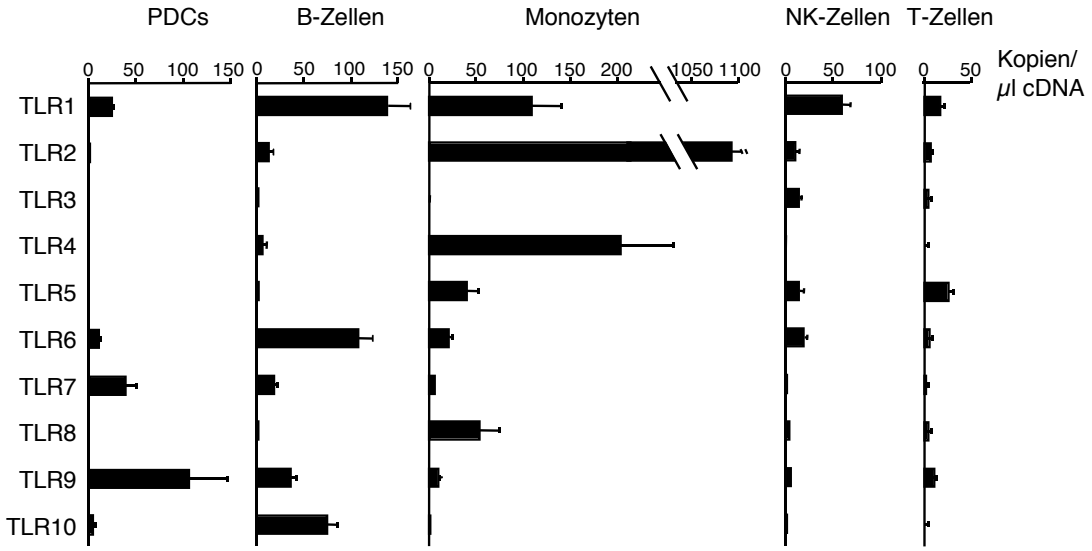


**Abb. 2 Quantitative Analyse der TLR1-10 mRNA-Expression in PDCs, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen**

Isolierte PDCs (50.000 - 100.000 Zellen/ Ansatz), B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen (jeweils $2x10^6$ Zellen/ Ansatz) wurden in komplettem IMDM-Vollmedium inkubiert. Nach 3 h Kultur wurde die zytoplasmatische RNA extrahiert und mit reverser Transkription umgeschrieben. Die erhaltene cDNA wurde in einer *real-time*-PCR mit Primerpaaren für TLR1-10 eingesetzt. Die dargestellte TLR-Kopienzahl bezieht sich auf jeweils 1000 Transkripte des *housekeeping*-Gens Cyclophilin-B. Aus den erhaltenen Daten wurde jeweils der Mittelwert gebildet und der SEM berechnet. Gezeigt werden Daten aus entweder zehn (B-Zellen), neun (T-Zellen), acht (Monozyten) oder sechs (PDCs, NK-Zellen) unabhängigen Experimenten. Der SEM des Mittelwertes der TLR2-Expression für Monozyten betrug 198.

*3.1.2. Vergleich des TLR-Expressionmusters mit direkter CpG-ODN-Sensitivität*

Aufbauend auf diese Befunde sollte bestätigt werden, dass sowohl PDCs als auch B-Zellen, im Einklang mit ihrer deutlichen TLR9-Expression, direkt durch CpG-ODNs aktiviert werden können. Hierzu wurde die mRNA-Expression verschiedener Zytokine und Chemokine, als repräsentative Marker einer inflammatorischen Antwort, nach CpG-Stimulation untersucht.

Aufgereinigte PDCs oder B-Zellen wurden mit oder ohne CpG-ODNs inkubiert und anschließend nach 3 respektive 15 h die mRNA präpariert. Die *real-time*-PCR-Analyse ergab, dass ODN 2006 sowohl in PDCs als auch B-Zellen innerhalb von 3 h eine deutliche Induktion des proinflammatorischen Chemokins *Macrophage inflammatory protein-1*$\alpha$ (MIP-1$\alpha$) bewirkte (siehe Abb. 3). Interessanterweise zeigte sich, dass ODN 2216 erst zu einem späteren Zeitpunkt eine maximale Induktion dieses Chemokins in PDCs bewirkte. Weiterhin ließ sich beobachten, dass ODN 2006 die Transkription dieses Chemokins in B-Zellen deutlich stärker induzierte. Ähnliche Resultate ergaben sich bei der Messung weiterer sogenannter proinflammatorischer Chemokine wie IL-8 und MIP-1$\beta$. Vertreter sogenannter homöostatischer Chemokine wie *Thymus and activation-regulated chemokine* (TARC) und *Macrophage derived chemokine* (MDC) wurden jedoch kaum auf CpG-Stimulation induziert (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse konnten somit eindeutig belegen, dass sowohl B-Zellen als auch PDCs direkt durch CpG-ODNs stimuliert werden können.

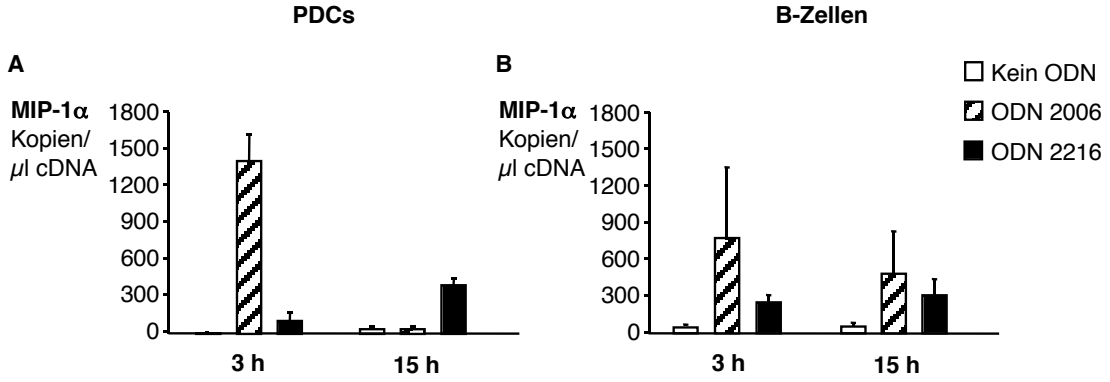


**Abb. 3 CpG induziert die mRNA-Expression von MIP-1$\alpha$ in PDCs und B-Zellen**

Isolierte PDCs (50.000 - 100.000 Zellen/ Ansatz) oder B-Zellen ($2x10^6$ Zellen/ Ansatz) wurden entweder mit ODN 2006 bzw. 2216 oder ohne Stimulus inkubiert. Nach 3 bzw. 15 h Kultur wurden die Zellen geerntet, die zytoplasmatische RNA extrahiert und mit reverser Transkription umgeschrieben. Die erhaltene cDNA wurde in einer *real-time*-PCR mit Primerpaaren für MIP-1$\alpha$ eingesetzt. Die Ergebnisse sind als Kopien/ $\mu$l cDNA dargestellt. Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte mit dem korrespondierenden SEM für vier (PDCs) bzw. zwei (B-Zellen) unabhängige Versuche.

### *3.1.3. Modulation der TLR7- und TLR9-Expression in B-Zellen und PDCs nach Stimulation mit CpG-DNA*

Um TLRs zu identifizieren, die möglicherweise an der Detektion von CpG-DNA im humanen System beteiligt sind, wurde die Expression derjenigen TLRs genauer analysiert, die lediglich von B-Zellen und PDCs, jedoch nicht von Monozyten, NK-Zellen oder T-Zellen exprimiert wurden. Den eigenen Messungen zufolge trafen diese Kriterien lediglich auf TLR7 und TLR9 zu (siehe Abb. 2). Da TLR1 und TLR6 nicht exklusiv in PDCs und B-Zellen nachweisbar waren, schieden diese TLRs als hinlängliche Voraussetzung einer CpG-DNA-Erkennung aus. Ihrem Expressionsmuster nach könnten sie jedoch eine modulierende Rolle in der CpG-DNA-Erkennung einnehmen, wie es z.B. für TLR1 und TLR6 bei der Erkennung von Zymosan bzw. Peptidoglykanen durch TLR2 beschrieben ist [Ozinsky, 2000].

Es wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben, dass mikrobielle Stimuli die Expression ihrer zugehörigen PRRs beeinflussen [Poltorak, 1998; Muzio, 2000; Nomura, 2000; Visintin, 2001]. Es erschien somit plausibel, dass durch Stimulation mit CpG-DNA die Expression des mutmaßlichen CpG-TLRs spezifisch moduliert werden würde. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden aufgereinigte B-Zellen und PDCs für 3 bzw. 15 h mit oder ohne CpG-ODNs inkubiert und anschließend die mRNA-Expression derjenigen TLRs quantifiziert, die auf beiden Zellpopulationen vertreten waren (TLR1, TLR6, TLR7 und TLR9).

In B-Zellen war nach Inkubation mit ODN 2006 eine deutlich verminderte Expression von TLR9 nach sowohl 3 als auch 15 h zu beobachten. Auch eine verminderte TLR7-Expression wurde durch Stimulation mit ODN 2006 nach 15 h erreicht. ODN 2216 zeigte wiederum geringere Effekte auf B-Zellen, wobei es sich überraschenderweise durch eine dem ODN 2006 gegenläufige Beeinflussung der TLR7-Expression auszeichnete. In PDCs kam es durch Stimulation mit ODNs beider Klassen zu einer deutlich rückläufigen Expression von TLR9. Einen ähnlichen Abfall der TLR9-Expression in PDCs bewirkte die Inkubation mit dem Wachstumsfaktor IL-3, der analog zu CpG-DNA eine Ausreifung von PDCs erreicht. IL-3 bewirkte überdies eine verminderte Expression von TLR7, wobei im Gegensatz dazu CpG-ODN zu einer deutlichen Induktion dieses TLRs führte. Die mRNA-Expressionslevel von TLR1 und TLR6 wurden durch Zugabe von CpG-ODN nicht signifikant beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

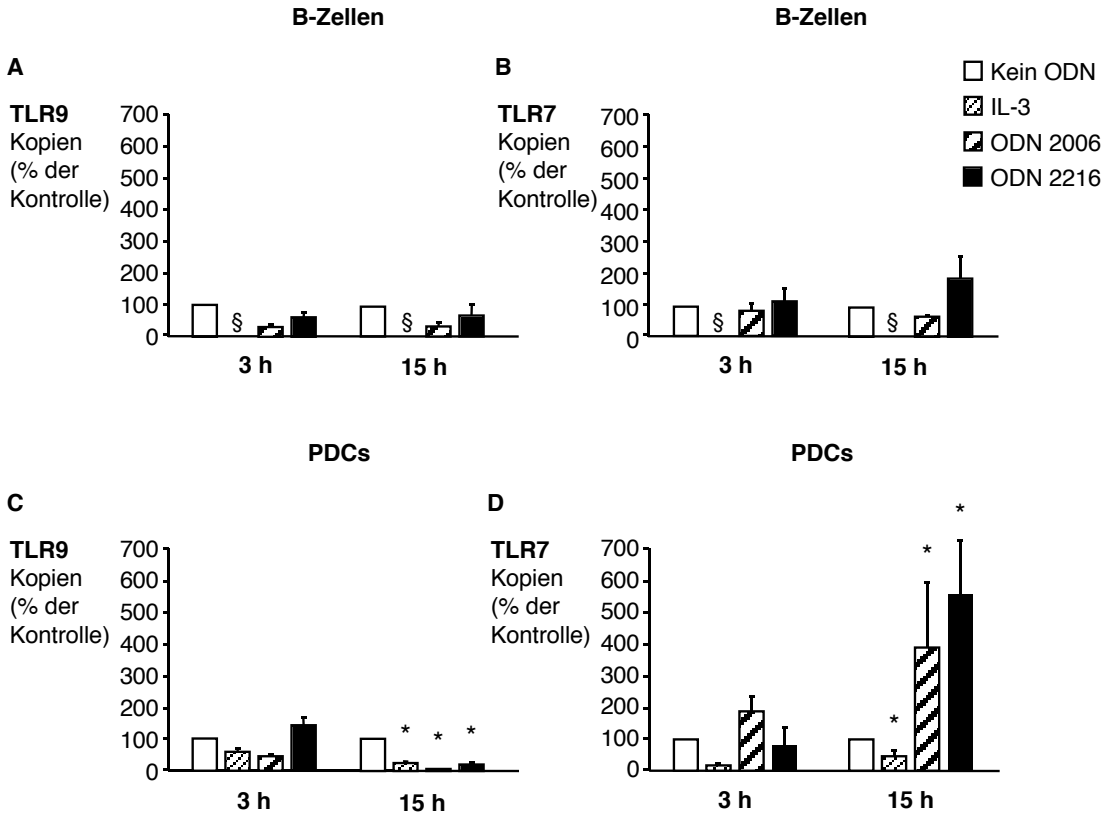


**Abb. 4 Nach Stimulation mit CpG-ODN regulieren PDCs TLR9 auf mRNA-Ebene herunter und TLR7 hoch**

Isolierte PDCs (50.000 - 100.000 Zellen/ Ansatz) oder B-Zellen ($2x10^6$ Zellen/ Ansatz) wurden entweder mit ODN 2006 bzw. 2216, 10 ng/ ml IL-3 (nur PDCs) oder ohne Stimulus inkubiert. Nach 3 bzw. 15 h Kultur wurden die Zellen geerntet, die zytoplasmatische RNA extrahiert und mit reverser Transkription umgeschrieben. Die erhaltene cDNA wurde in einer *real-time*-PCR mit Primerpaaren für TLR9 und TLR7 eingesetzt. Die Daten für TLR9 mRNA (A/ C) und TLR7 mRNA (B/ D) sind als Vielfaches der unstimulierten Probe präsentiert. Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte mit dem korrespondierenden SEM für jeweils vier unabhängige Versuche (* = $p < 0,05$ gegenüber der Probe „Kein ODN"; § = Werte wurden nicht bestimmt).

Im Folgenden näher beschriebene Untersuchungen konnten zeigen, dass im Gegensatz zu PDCs und B-Zellen im humanen Immunsystem T-Zellen und NK-Zellen nicht direkt durch CpG-DNA aktiviert werden können. Zusätzlich konnten parallel von Stefanie Britsch und Andreas Towarowski in unserem Labor durchgeführte Experimente belegen, dass auch Monozyten und MDCs nicht direkt auf CpG-Stimulation reagieren. Folglich konnten innerhalb von PBMCs PDCs und B-Zellen als die einzigen, direkt auf CpG-DNA reagierenden Zellpopulationen identifiziert werden.

## 3.2. Wirkung von CpG-DNA als Adjuvans in der Aktivierung von T-Zellen und NK-Zellen *in vitro*

### *3.2.1. CpG-Oligodesoxynukleotide steigern IFN Typ I-abhängig die Immunantwort von γδ T-Zellen und NK-Zellen*

Mehrere Studien haben im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt, dass CpG-DNA im murinen als auch im humanen System, in Konkordanz mit dem oben beschriebenen TLR-Expressionsmuster, zu einer direkten Stimulation von B-Zellen und bestimmten Subpopulationen von DCs führt [Krieg, 1995; Sparwasser, 1998; Hartmann, 1999b; Hartmann, 2000a; Bauer, 2001a; Kadowaki, 2001a]. Auch aktivierende Effekte auf NK-Zellen und T-Zellen wurden beschrieben. Hierbei wurden jedoch sowohl indirekte als auch direkte Mechanismen der beobachteten Aktivierung äußerst kontrovers diskutiert [Ballas, 1996; Sun, 1998; Bendigs, 1999; Bohle, 1999; Iho, 1999; Kranzer, 2000; Lipford, 2000a; Verthelyi, 2001]. Da eine Vielzahl differierender CpG-ODNs in den bis dato publizierten Studien eingesetzt wurde, um NK-Zellen und T-Zellen zu stimulieren, sollten zu Beginn in Vorversuchen die Wirkung der eigenen ODNs auf verschiedene Lymphozytenpopulationen ermittelt werden. Hierzu wurden PBMCs mit verschiedenen ODNs inkubiert und die Expression von CD69 bestimmt, einem äußerst sensitiven Aktivierungsmarker, der auf den meisten Lymphozyten sehr rasch und auf unspezifische Stimulation hochreguliert wird [Testi, 1989]. Die leichte Reproduzierbarkeit dieses Versuchsansatzes und die Möglichkeit einer exakten Populationsabgrenzung in der 4-Farben FACS-Analyse erlaubte eine schnelle und umfassende Bestimmung der CD69-Expression auf vielen verschiedenen Lymphozytenpopulationen. Zur genauen Typisierung der einzelnen Lymphozytensubpopulationen in der Durchflusszytometrie wurde ein breites Spektrum von Oberflächenantigenen gegengefärbt (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, MHC-II, TCR-αβ und Vγ9/ Vδ2).

3.2.1.1. γδ T-Zellen und NK-Zellen werden durch CpG-Stimulation innerhalb von PBMCs aktiviert

Neben der bereits bekannten Expressionssteigerung von CD69 auf B-Zellen (Daten nicht gezeigt) und NK-Zellen zeigte sich, dass durch CpG-Stimulation von PBMCs auch auf T-Zellen eine erhöhte CD69-Expression induzierbar war. Während jedoch auf der breiten Masse der B- und NK-Zellen eine durchgängige Zunahme der CD69-Expression zu beobachten war, zeigte sich, dass in der Gesamtpopulation der CD3-positiven Zellen lediglich eine kleine Zellfraktion den Aktivierungsmarker CD69 hochregulierte. Gegenfärbungen im FACS ergaben, dass diese Subpopulation zum größten Teil CD56-positive, CD4- und CD8-negative T-Zellen beinhaltete. Genauere Analysen zeigten, dass es sich bei dieser Zellfraktion fast ausschließlich um T-Zellen handelte, die positiv waren für die Vγ9 und Vδ2-Kette des TZRs und somit die Hauptpopulation der γδ T-Zellen des peripheren Bluts repräsentierten. Im Folgenden konzentrierte sich die Arbeit somit auf die Charakterisierung und Quantifizierung der beobachteten CpG-Effekte auf NK- und γδ T-Zellen.

Eine umfassende Analyse der CD69-Expression auf γδ T-Zellen und NK-Zellen offenbarte eine konsistente Hochregulation dieses Aktivierungsmarkers nach CpG-Stimulation. Da jedoch zwischen den verschiedenen Spendern eine erhebliche Variabilität in der Grund-Expression dieses Markers auf sowohl γδ T-Zellen als auch auf NK-Zellen zu beobachten war, erschien eine Mittelung des Vielfachens der CD69-Induktion für die Auswertung der Ergebnisse als sinnvoller. Abb. 5 zeigt deshalb eine Zusammenfassung der Werte des Vielfachens der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der CD69-Expression auf γδ T-Zellen respektive NK-Zellen (MFI-Mittelwerte CD69 auf γδ T-Zellen: Mittelwert 15,8 ± 3,4; n = 28; NK-Zellen: Mittelwert 5,3 ± 1,2; n = 8). ODN 2006 erwies sich sowohl für NK-Zellen als auch für γδ T-Zellen als schwächerer Induktor von CD69 im Vergleich zu ODN 1585 und 2216, welche beide große Mengen IFN Typ I in PBMCs induzieren [Krug, 2001a]. Das Kontroll-ODN 2243 (GC-Kontrolle für ODN 2216), welches kein IFN Typ I in PBMCs induziert, bewirkte hingegen weder eine Aktivierung von γδ T-Zellen (siehe Abb. 6A) noch von NK-Zellen (Daten nicht gezeigt). Wie oben erläutert war der stimulatorische Effekt von CpG-ODNs auf αβ T-Zellen relativ gering (MFI-Mittelwerte CD69 auf αβ T-Zellen: kein ODN: 3,9 ± 0,4; ODN 2006: 5,9 ± 0,8; ODN 1585: 9,8 ± 1,7; ODN 2216: 7,9 ± 1,0; Daten nicht gezeigt).

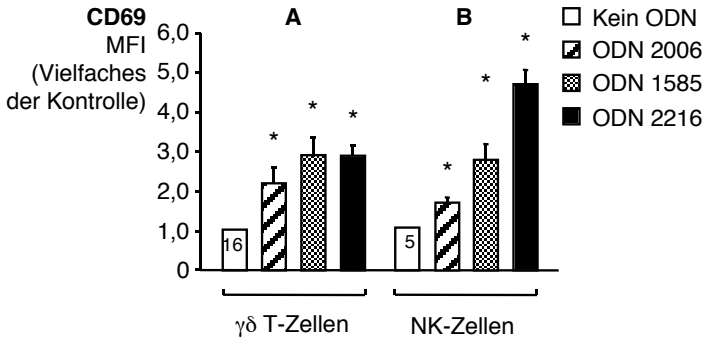


**Abb. 5 CpG-ODNs induzieren eine Steigerung der CD69-Expression auf γδ T-Zellen und NK-Zellen**

PBMCs (2 x $10^6$/ ml) wurden mit verschiedenen ODNs (6 µg/ ml) stimuliert. Nach 48 h wurde die CD69-Expression auf γδT-Zellen **(A)**, αβ T-Zellen (Daten nicht gezeigt) und NK-Zellen **(B)** in einer 4-Farben FACS-Analyse bestimmt. Die Mittelwerte des Vielfachens der MFI der CD69-Expression aller Versuche wurden zusammengefasst. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM der Werte des Vielfachens. Die Absolutwerte der MFI-Mittelwerte der Mediumkontrollen sind in den offenen Balken angezeigt. Die Anzahl der Versuche betrug für die γδ T-Zell-Stimulationen 15, 12, 15 bzw. 13 und für die NK-Zell-Stimulationen 6, 5, 5 bzw. 6 (Mediumkontrolle, ODN 2006, ODN 1585, ODN 2216) (* = $p < 0,05$ gegenüber der Probe „Kein ODN").

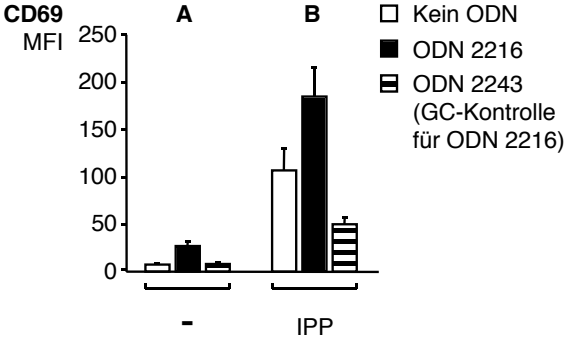


**Abb. 6 Die ODN-vermittelte CD69-Induktion auf γδ T-Zellen ist abhängig von sogenannten CpG-Motiven**

PBMCs (2 x $10^6$/ ml) wurden mit dem ODN 2216 und dem dazugehörigem Kontroll-ODN 2243 (CG-Motive in GC vertauscht) zu 6 µg/ ml ohne **(A)** oder mit **(B)** dem γδT-Zell-Antigen IPP stimuliert. Nach 48 h wurde die CD69-Expression auf γδ T-Zellen und auf αβ T-Zellen (Daten nicht gezeigt) in einer 4-Farben FACS-Analyse bestimmt. Die Mittelwerte des MFI der CD69-Expression von drei Versuchen wurden zusammengefasst. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM der Mittelwerte.

### 3.2.1.2. CpG-ODNs kostimulieren eine Antigen-induzierte Aktivierung von γδ T-Zellen und NK-Zellen innerhalb von PBMCs

Frühere Publikationen hatten für das murine und das humane System gezeigt, dass in Anwesenheit eines Antigenstimulus NK-Zellen synergistisch durch Zugabe von

CpG-DNA aktiviert werden können. Auch *in vivo*-Daten zu einem kostimulatorischen CpG-Effekt auf murine T-Zellen waren bekannt [Sun, 1998]. In Anlehnung an diese Beobachtungen sollte in weiteren Experimenten der potenzielle Synergismus einer kombinierten CpG- und Antigenstimulation auf Einzelzellebene bestimmt werden. Um eine spezifische Stimulation von γδ T-Zellen zu erreichen, wurde Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) als Antigen eingesetzt. IPP ist ein Phospho-Antigen aus der Gruppe der kleinen Nicht-Peptid-Antigene, welche von den meisten Vγ9+ γδ T-Zellen des peripheren Blutes über ihren TZR erkannt werden [Tanaka, 1995]. Als NK-Zell-Antigen wurden Daudi-Zellen eingesetzt, NK-Zell-sensitive Zellen, die keine MHC-I-Moleküle exprimieren und ferner unbekannte Liganden tragen, die von γδ T-Zellen erkannt werden [Fisch, 1997].

IPP und Daudi-Zellen alleine induzierten eine Hochregulation von CD69 auf γδ T-Zellen und NK-Zellen (siehe Abb. 7 offene Balken). Zugabe von CpG-DNA bewirkte auf diesen beiden Zellepopulationen eine starke Zunahme der IPP- oder Daudi-Zell-induzierten CD69-Expression (siehe Abb. 7). In diesem kostimulatorischen Ansatz zeigte sich abermals, dass ODN 2216 und ODN 1585 effektiver waren als ODN 2006, eine Antigen-abhängige Aktivierung dieser Zellen synergistisch zu steigern. Der Einsatz des GC-Kontroll-ODNs 2243 führte interessanterweise nicht nur zu einer Nivellierung dieses Effektes, sondern sogar zu einer Abnahme des Aktivierungsgrades (siehe Abb. 6B).

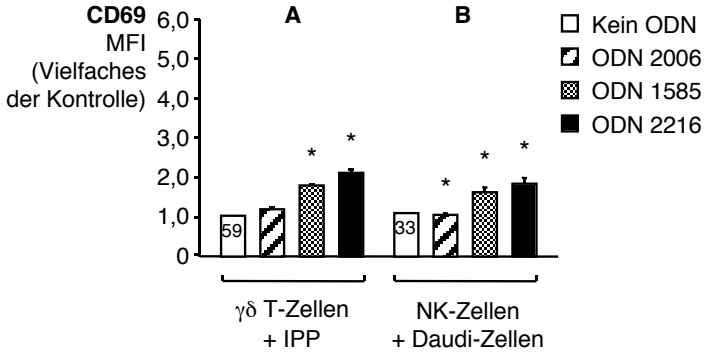


**Abb. 7 CpG-ODNs führen zu einer synergistischen Steigerung der Antigen-vermittelten CD69-Expression auf γδ T-Zellen und NK-Zellen**

PBMCs (2 x $10^6$/ ml) wurden mit verschiedenen ODNs (6 µg/ ml) mit IPP oder bestrahlten Zellen der Zelllinie Daudi (5 x $10^5$/ ml) stimuliert. Nach 48 h wurde die CD69-Expression auf γδ T-Zellen **(A)**, αβ T-Zellen (Daten nicht gezeigt) und NK-Zellen **(B)** in einer 4-Farben FACS-Analyse bestimmt. Die Mittelwerte des Vielfachens der MFI der CD69-Expression aller Versuche wurden zusammengefasst. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM der Werte des Vielfachens. Die Absolutwerte der MFI-Mittelwerte der Mediumkontrollen sind in den offenen Balken angezeigt. Die Anzahl der Versuche betrug für die γδ T-Zell-Stimulationen 20, 18, 20 bzw. 18 und für die NK-Zell-Stimulationen 6 (Mediumkontrolle, ODN 2006, ODN 1585, ODN 2216) (* = $p < 0,05$ gegenüber der Probe „Kein ODN“).

3.2.1.3. γδ T-Zellen und NK-Zellen sind die IFN-γ-Produzenten innerhalb von PBMCs nach CpG-ODN-Stimulation

Frühere Arbeiten hatten demonstriert, dass die Stimulation mit CpG-DNA eine beträchtliche IFN-γ-Produktion in PBMCs induziert. Die Produktion dieses Zytokins wurde bis dato ausschließlich der Population der NK-Zellen zugeschrieben, eine genaue Typisierung der IFN-γ-produzierenden Zellen war jedoch nicht erfolgt [Bohle, 1999; Kranzer, 2000]. Eigene Vorversuche konnten in der Tat bestätigen, dass die alleinige Zugabe eines CpG-ODNs eine deutliche Steigerung der IFN-γ-Produktion innerhalb von PBMCs bewirkte. Wiederum war hierbei eine Überlegenheit der ODNs 2216 und 1585 gegenüber dem ODN 2006 zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Auch die durch einen Antigenstimulus induzierte IFN-γ-Produktion ließ sich innerhalb von PBMCs durch CpG-Stimulation deutlich steigern. CpG-ODN-Zugabe in Anwesenheit der Zelllinie Daudi zeigte eine synergistische Steigerung der IFN-γ-Produktion im Überstand von PBMCs auf bis zu zwanzigfache Werte im Vergleich zu alleiniger Daudi-Zellstimulation. Da jedoch die Zelllinie Daudi sowohl für NK-Zellen als auch für γδ T-Zellen einen Antigenstimulus darstellt, ließen diese Ergebnisse keine eindeutige Zuordnung der IFN-γ-Produktion zu den NK-Zellen respektive γδ T-Zellen zu. Wurde IPP als spezifisches γδ T-Zell-Antigen eingesetzt, zeigte sich jedoch ebenfalls eine synergistische Steigerung der IFN-γ-Produktion im Überstand von CpG-ODN-stimulierten PBMCs (siehe Abb. 8A).

Der genaue Nachweis der IFN-γ-produzierenden Zellen erfolgte in einer intrazellulären Zytokinmessung im FACS. Hierbei zeigte sich konsistent, dass sowohl γδ T-Zellen als auch NK-Zellen IFN-γ auf alleinige CpG-ODN-Stimulation auf Einzelzellebene produzierten. IPP alleine induzierte eine IFN-γ-Produktion in γδ T-Zellen (siehe Abb. 8B und C), aber sonst in keiner weiteren Zellpopulation (Daten nicht gezeigt). Daudi-Zellen steigerten die IFN-γ-Synthese sowohl in γδ T-Zellen (Daten nicht gezeigt) als auch in NK-Zellen (siehe Abb. 8D und E). In Kombination mit CpG-ODNs kam es bei beiden Zellpopulationen zu einer deutlichen Steigerung der Zytokinproduktion, wobei, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der CD69-Messungen, die ODNs 2216 und 1585 dem ODN 2006 deutlich überlegen waren. Im Gegensatz hierzu kam es in αβ T-Zellen zu keiner signifikanten Steigerung der IFN-γ-Produktion (Daten nicht gezeigt).

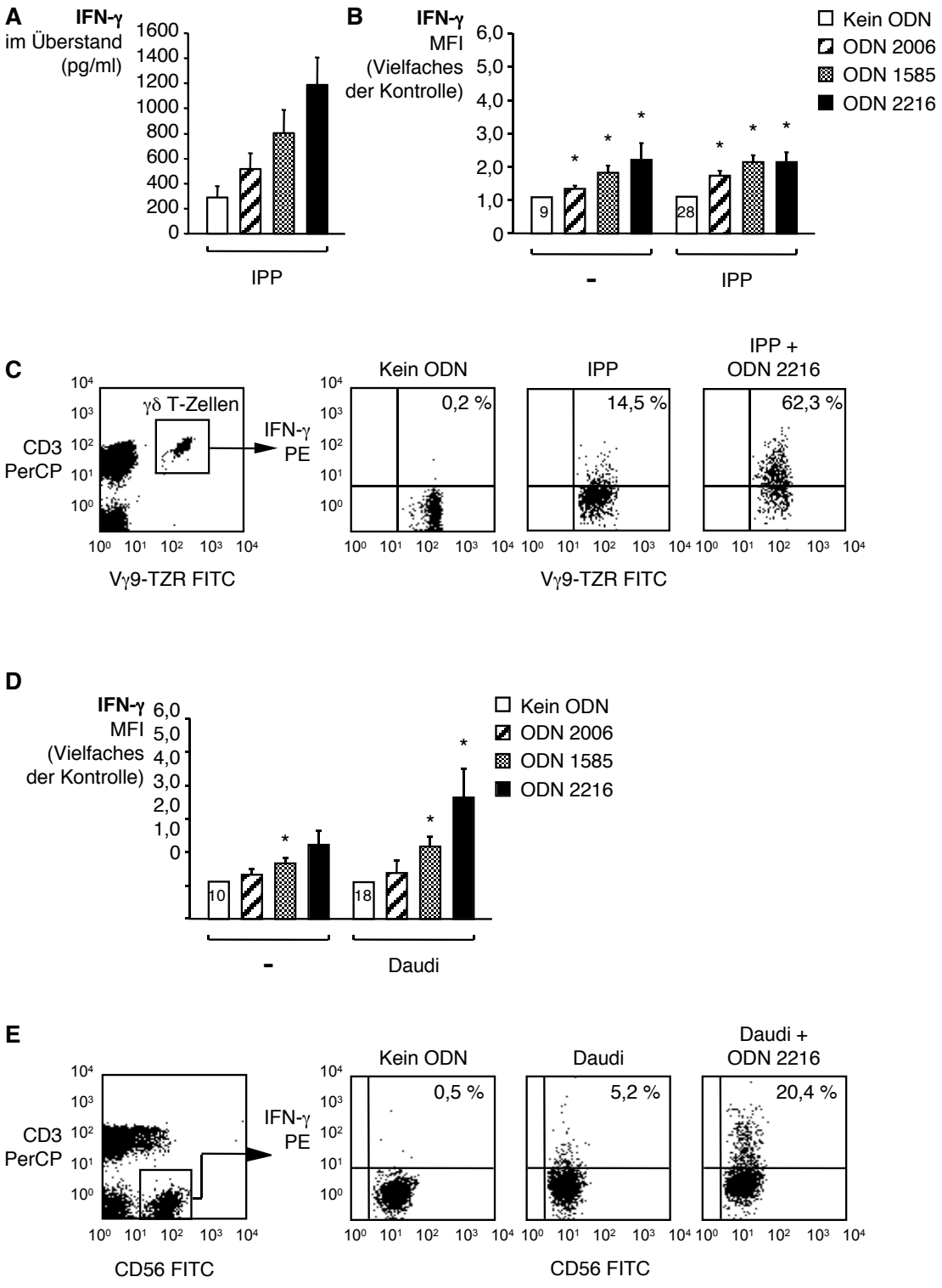
A
IFN-γ
im Überstand
(pg/ml)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
IPP
B
IFN-γ
MFI
(Vielfaches
der Kontrolle)
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0
9
28
-
IPP
Kein ODN
ODN 2006
ODN 1585
ODN 2216
C
γδ T-Zellen
CD3
PerCP
IFN-γ
PE
Vγ9-TZR FITC
Kein ODN
IPP
IPP +
ODN 2216
0,2 %
14,5 %
62,3 %
D
IFN-γ
MFI
(Vielfaches
der Kontrolle)
10
18
-
Daudi
E
CD3
PerCP
IFN-γ
PE
CD56 FITC
Kein ODN
Daudi
Daudi +
ODN 2216
0,5 %
5,2 %
20,4 %

**Abb. 8 CpG-ODNs steigern synergistisch die IFN-γ-Produktion stimulierter γδ T-Zellen.**

PBMCs (2 x $10^6$/ ml) wurden mit verschiedenen ODNs (6 µg/ ml) mit IPP oder bestrahlten Zellen der Zelllinie Daudi (5 x $10^5$/ ml) stimuliert. **(A)** Nach 48 h wurde IFN-γ im Überstand mittels ELISA bestimmt (untere Detektionsgrenze 100 pg/ ml). Die Ergebnisse aus neun unabhängigen Versuchen wurden zu Mittelwerten zusammengefasst und sind mit dem korrespondierenden SEM dargestellt. Weiterhin wurde nach 48 h der intrazelluläre IFN-γ-Gehalt in γδ T-Zellen **(B/C)**, αβ T-Zellen (Daten nicht gezeigt) und NK-Zellen **(D/E)** in einer 4-Farben FACS-Analyse bestimmt. Die Abbildungen **C** und **E** zeigen an einem Beispiel die Steigerung der IFN-γ-Produktion in γδ T-Zellen bzw. NK-Zellen durch das ODN 2216. Die Werte im rechten oberen Quadranten entsprechen dem prozentualen Anteil an IFN-γ-positiven Zellen, der anhand einer Isotypkontrolle ermittelt wurde. In Abbildung **B** und **D** sind die Mittelwerte des Vielfachens des prozentualen Anteils an IFN-γ-positiven Zellen zusammengefasst. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM der Werte des Vielfachens. Die Absolutwerte der Mittelwerte der Mediumkontrollen sind in den offenen Balken angezeigt. Für γδ T-Zellen betrug die Anzahl der Versuche für die Bedingungen ohne Antigen 16, 14, 16 bzw. 10 und für die Bedingungen mit Antigen 18, 18, 20 bzw. 13. Für NK-Zellen betrug die Anzahl der Versuche für die Bedingungen ohne Antigen 9, 4, 9 bzw. 4 und für die Bedingungen mit Antigen 5, 5, 4 bzw. 5 (Mediumkontrolle, ODN 2006, ODN 1585, ODN 2216) (* = $p < 0,05$ gegenüber der Probe „Kein ODN“).

### 3.2.1.4. CpG-ODNs steigern synergistisch die Proliferation IPP-stimulierter γδ T-Zellen

Weiterhin wurde die Proliferation von IPP-stimulierten γδ T-Zellen in Abhängigkeit von CpG-ODN-Zugabe untersucht. Durch die Literatur und eigene Vorversuche war bekannt, dass es möglich ist, *in vitro* γδ T-Zellen innerhalb von PBMCs durch Zugabe ihres spezifischen Antigens IPP zur Proliferation anzuregen. Untersuchungen auf Zellteilung mittels CFSE-Färbung hatten in Vorversuchen bestätigt, dass eine echte Proliferation der stimulierten γδ T-Zellen stattgefunden hatte und es sich nicht nur um einen Überlebenseffekt der aktivierten Zellen handelte. Die proliferative Antwort auf den Antigenstimulus IPP ließ sich somit zu verschiedenen Zeitpunkten durch eine Bestimmung des prozentualen Anteils der γδ T-Zellen an allen CD3+ T-Zellen im FACS verfolgen (siehe Abb. 9A).

Eine Zusammenfassung von mehreren Versuchen zeigte, dass lediglich ODN 1585 und ODN 2216 konsistent die Proliferation von γδ T-Zellen auf IPP-Stimulation erhöhten, während hingegen ODN 2006 unterschiedliche Resultate lieferte (siehe Abb. 9B und C). Bei manchen Spendern kam es in Anwesenheit von ODN 2006 sogar zu einer verminderten proliferativen Antwort auf den Antigenstimulus IPP (siehe Abb. 9C). Ein alleiniger CpG-Zusatz ohne IPP führte jedoch nicht zur Proliferation von γδ T-Zellen.

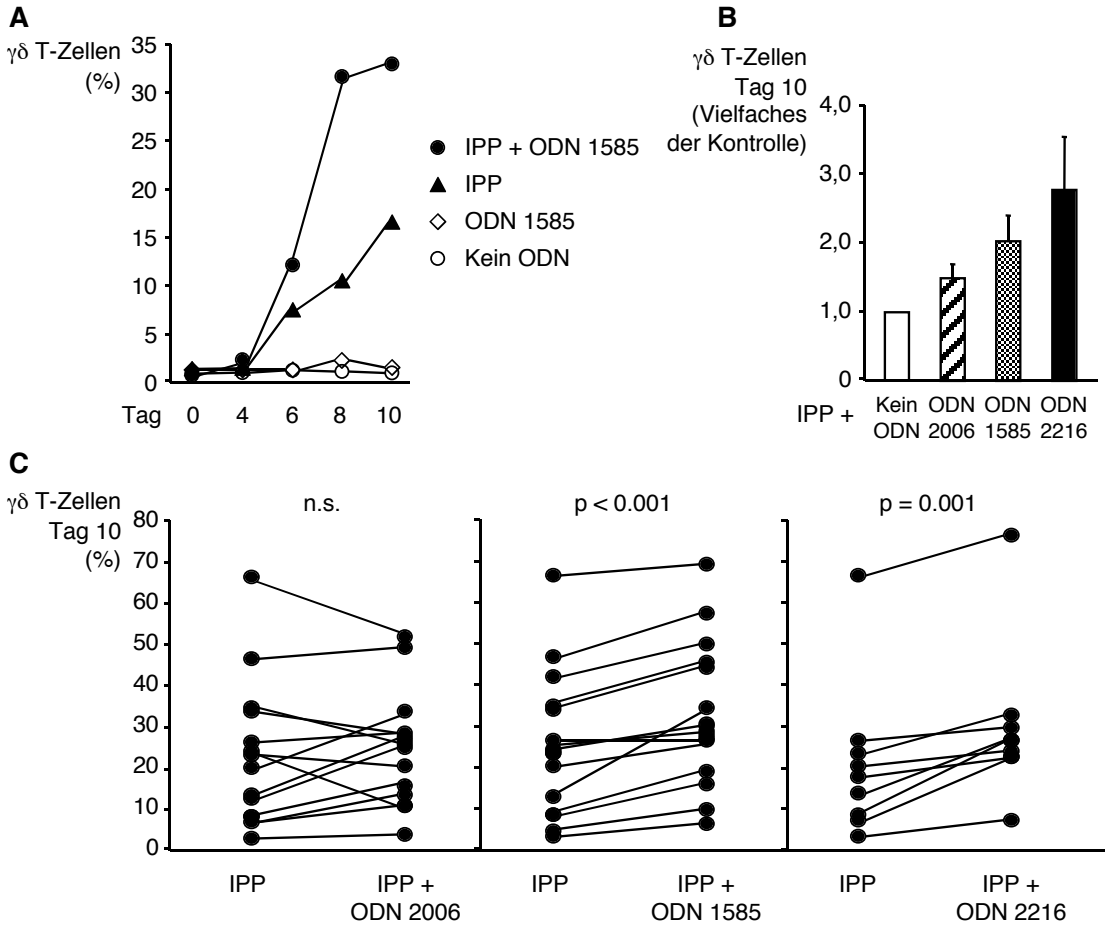


**Abb. 9 Gesteigerte Proliferation von γδ T-Zellen nach IPP-Stimulation durch CpG-ODN**

PBMCs (2 x $10^6$/ ml) wurden mit verschiedenen ODNs (6 $\mu$g/ ml) mit oder ohne dem γδ T-Zell-Antigen IPP stimuliert. Nach 0, 4, 6, 8 und 10 Tagen wurde der prozentuale Anteil von γδ T-Zellen an allen T-Zellen in einer 4-Farben FACS-Analyse bestimmt. Abb. **A** zeigt an einem repräsentativen Beispiel die synergistische Steigerung der Proliferation durch das ODN 1585. In Abb. **B** sind die Mittelwerte aller Messungen des 10. Tages zusammengefasst. Es wurde das Vielfache des prozentualen Anteils von γδT-Zellen an der Gesamtpopulation der T-Zellen bestimmt und zusammengefasst. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM der Werte des Vielfachens. Abb. **C** zeigt die dazugehörigen Absolutwerte, wobei jeweils die CpG-ODN-Werte den Werten der Mediumkontrolle gegenübergestellt wurden.

3.2.1.5. CpG-ODNs induzieren die Perforin-Produktion in γδ T-Zellen und NK-Zellen und erhöhen ihre lytische Aktivität

Frühere Publikationen haben darauf verwiesen, dass CpG-ODNs in humanen PBMCs und murinen Milz-Zellen eine erhöhte lytische Aktivität induzieren. Dieser Effekt lässt sich im Maussystem der Population der NK1.1+ Zellen zuschreiben, die der humanen Population der NK-Zellen entspricht [Ballas, 1996].

Um den Einfluss der untersuchten CpG-ODNs auf die lytische Aktivität verschiedener Zellpopulationen zu untersuchen, wurde ein $^{51}$Chrom-Lyse-Test etabliert, in dem entweder Daudi-Zellen oder K562-Zellen als $^{51}$Chrom-markierte Zielzellen eingesetzt wurden. Es wurden dabei entweder PBMCs, NK-Zellen oder γδ T-Zellen, die innerhalb von PBMCs mit CpG-ODNs stimuliert worden waren, aufgereinigt und als Effektoren in dem Zytotox-Versuch eingesetzt.

Sowohl ODN 2216 als auch ODN 1585 erhöhten deutlich die Lyse von Daudi-Zellen durch PBMCs, γδ T-Zellen als auch NK-Zellen (siehe Abb. 10A, B und C), wohingegen ODN 2006 kaum einen Effekt erzielte. Ähnliche Ergebnisse für PBMCs und NK-Zellen wurden erzielt, wenn die Zelllinie K562 als Lyse-Ziel eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt).

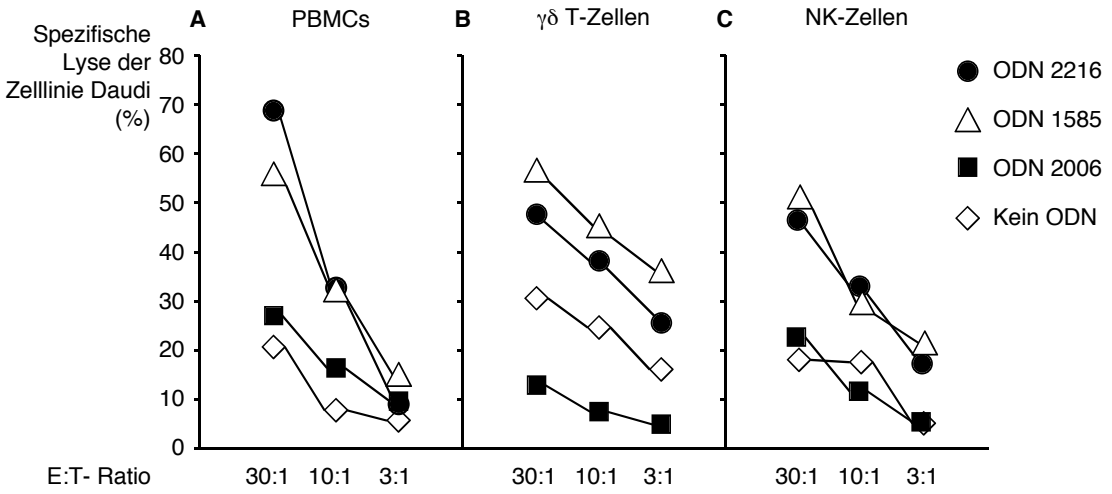


**Abb. 10 CpG-ODNs erhöhen die lytische Aktivität von PBMCs, NK-Zellen und γδ T-Zellen**

**A:** PBMCs wurden für 18 h mit verschiedenen ODNs (6 μg/ ml) stimuliert und anschließend in einem $^{51}$Chrom-Lyse-Test als Effektorzellen in der angegebenen E:T-Ratio eingesetzt. **B/ C:** NK-Zellen oder γδ T-Zellen wurden innerhalb von PBMCs inkubiert und mit verschiedenen ODNs (6 μg/ ml) stimuliert. Anschließend wurden sie aufgereinigt (Reinheit > 95 %) und in einem $^{51}$Chrom-Lyse-Test als Effektorzellen in der angegebenen E:T-Ratio eingesetzt. Als Zielzelle wurde jeweils die Daudi-Zelllinie verwendet. Die Abb. zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen mit ähnlichen Resultaten.

Zurzeit sind drei Haupt-Mechanismen bekannt, die eine zellgebundene Lyse durch zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen vermitteln [Squier, 1994]. Dazu gehören der Fas-Fasligand-Mechanismus, der TNF-TNFR-Mechanismus und die Ausschüttung lytischer Granula. Eigene Messungen hatten ausgeschlossen, dass weder eine vermehrte Expression von Fasligand auf den Effektorzellen noch eine erhöhte TNF-Ausschüttung für die beobachteten Effekte in dem untersuchten Lyse-Versuchsansatz verantwortlich sein konnten (Daten nicht gezeigt). Demzufolge wurde letztlich die Expression von Perforin, als eine mögliche Ursache erhöhter Zytotoxizität mittels lytischer Granula, bestimmt.

Wie Abb. 11 zeigt, induzierte ODN 2216 alleine eine erhöhte Perforin-Expression in γδ T-Zellen und NK-Zellen und steigerte zusätzlich synergistisch eine Antigen-vermittelte Perforin-Produktion (siehe Abb. 11). ODN 2006 hingegen bewirkte keine signifikante Induktion von Perforin (Daten nicht gezeigt).

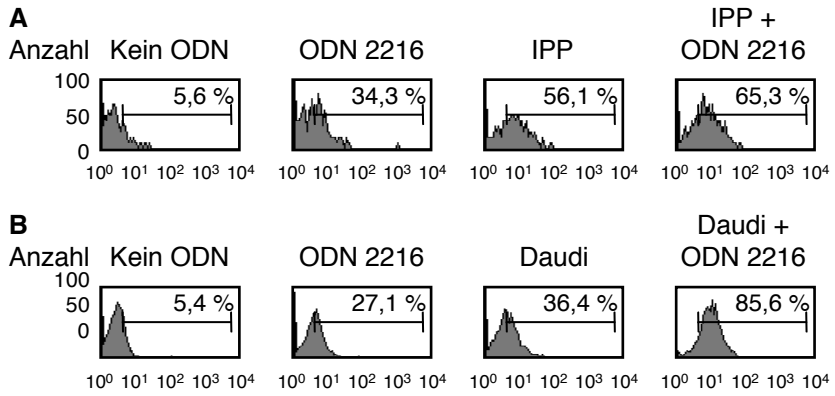


**Abb. 11 CpG-ODNs erhöhen den Perforin-Gehalt in γδ T-Zellen und NK-Zellen**

PBMCs (2 x $10^6$/ ml) wurden mit verschiedenen ODNs (6 µg/ ml) zusammen mit oder ohne bestrahlten Daudi-Zellen (5 x $10^5$/ ml) oder IPP stimuliert. Nach 18 h wurde der intrazelluläre Perforin-Gehalt in γδ T-Zellen **(A)** bzw. NK-Zellen **(B)** in einer 4-Farben FACS-Analyse bestimmt. Der Anteil an Perforin-positiven Zellen wurde anhand einer Isotypkontrolle ermittelt. Die Abb. zeigt jeweils ein repräsentatives Ergebnis für ODN 2216 aus drei unabhängigen Versuchen mit ähnlichen Resultaten.

3.2.1.6. γδ T-Zellen werden indirekt durch CpG-induzierte Zytokine aktiviert

Auch wenn schon lange ein löslicher Faktor im Verdacht stand, indirekt die CpG-vermittelten Effekte auf NK-Zellen und γδ T-Zellen zu verursachen, so ließen oben beschriebene Versuchsansätze eine direkte Aktivierung der untersuchten Zellen durch CpG-DNA nicht ausschließen. Eigene Messungen hatten immerhin eine marginale Expression von TLR9 in sowohl NK-Zellen als auch T-Zellen ergeben (siehe Abb. 2). Demzufolge musste zuerst eindeutig ausgeschlossen werden, dass CpG-ODNs eine direkte Stimulation von NK-Zellen bzw. γδ T-Zellen verursachen können. Hierzu wurde eine Serie von Experimenten durchgeführt, in denen γδ T-Zellen und NK-Zellen entweder in aufgereinigter Form oder im Kontext mit PBMCs stimuliert wurden. Die Inkubation isolierter Zellpopulationen im PBMC-Kontext erfolgte getrennt von den restlichen PBMCs mittels eines Transwell-Systems. Dieser Versuchsaufbau ließ lediglich den Austausch löslicher Faktoren zu, ein direkter Zell-Zellkontakt war jedoch nicht möglich.

Wie Abb. 12 demonstriert, konnten aufgereinigte γδ T-Zellen weder zu einer höheren CD69-Expression, IFN-γ-Produktion noch Zytotoxizität mittels CpG-ODNs angeregt werden. Eine allgemeine Nicht-Reaktivität, bedingt durch den Aufreinigungsprozess, ließ sich ausschließen, da durch eine Kontrollstimulation mit IPP oder IL-2 diese Effekte gleichwohl erzielt werden konnten. Bedingt durch den Versuchsaufbau konnten diese Experimente weiterhin demonstrieren, dass nicht ein Zell-Zellkontakt, sondern ein löslicher Faktor Mediator der indirekt vermittelten Effekte sein musste. Analoge Experimente mit NK-Zellen bestätigten diese Resultate (Daten nicht gezeigt).

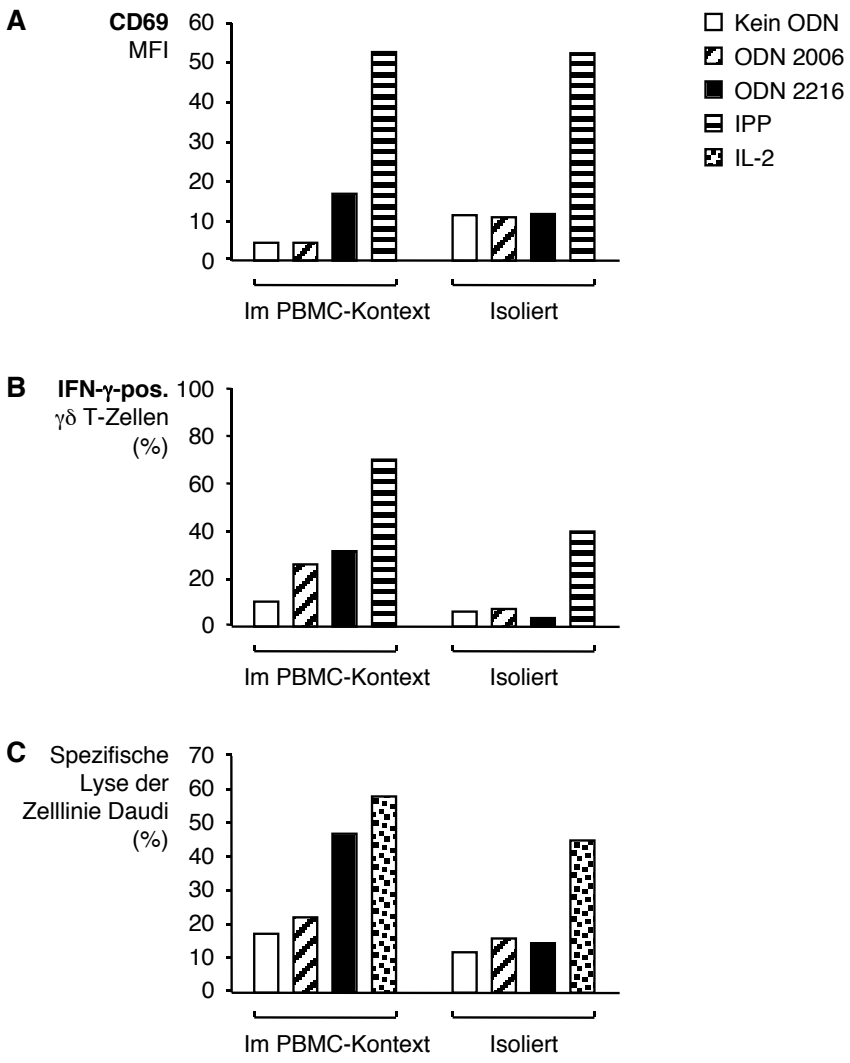


**Abb. 12 Aufgereinigte γδ T-Zellen werden nicht durch CpG-ODN aktiviert**

γδ T-Zellen wurden aufgereinigt und anschließend entweder isoliert oder in einem Transwell-System mit autologen PBMCs (PBMC-Kontext) mit verschiedenen ODNs (6 µg/ ml) oder IPP stimuliert. Nach 18 h wurde die CD69-Expression **(A)** bzw. der intrazelluläre IFN-γ-Gehalt **(B)** in einer 4-Farben FACS-Analyse bestimmt. **C:** Analog dazu wurden aufgereinigte γδT-Zellen entweder isoliert oder in einem Transwell-System mit autologen PBMCs (PBMC-Kontext) mit verschiedenen ODNs (6 µg/ ml) oder IL-2 (100 U/ ml) stimuliert. Nach 3 Tagen wurden sie in einem $^{51}$Chrom-Lyse-Test als Effektorzellen in der E:T-Ratio von 10:1 eingesetzt. Als Zielzelle wurde die Daudi-Zelllinie verwendet. Die Abb. zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2.1.7. Die CpG-vermittelte Aktivierung von γδ T-Zellen lässt sich durch IFN Typ I nachahmen

In verschiedenen vorausgegangenen Publikationen wurde unter anderem IFN Typ I als mögliches Zytokin der CpG-vermittelten Effekte auf NK-Zellen diskutiert [Ballas, 1996; Sun, 1998]. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten in der Tat bestätigt, dass große Mengen IFN Typ I durch bestimmte CpG-ODNs in PDCs induziert werden können [Krug, 2001a]. Ferner korrelierte die Fähigkeit dieser ODNs, IFN Typ I zu induzieren, bezeichnenderweise mit ihrer stimulatorischen Aktivität auf NK-Zellen und γδ T-Zellen. Beobachtungen zur Aktivierung von γδ T-Zellen durch IFN Typ I waren aus der Literatur jedoch nicht bekannt, so dass zuerst in eigenen Vorversuchen die Reaktivität von γδ T-Zellen auf diese Zytokine untersucht werden sollte.
Messungen im Überstand von PBMCs hatten ergeben, dass ca. 5000 U/ ml IFN-α und 500 U/ ml IFN-β unter den eigenen Versuchsbedingungen durch die ODNs 1585 und 2216 induziert wurden (siehe Abb. 13). Konsequenterweise wurden diese Zytokin-Konzentrationen für die folgenden Stimulations-Experimente gewählt.

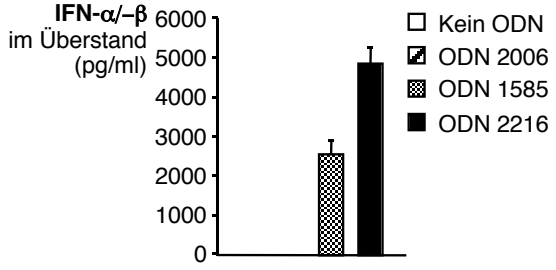


**Abb. 13 Lediglich ODN 1585 und ODN 2216 induzieren IFN-α in PBMCs**
PBMCs (2 x $10^6$/ ml) wurden mit verschiedenen ODNs (6 μg/ ml) inkubiert. Nach 48 h wurde im Überstand IFN-α mittels ELISA bestimmt (untere Detektionsgrenze 100 pg/ ml). Die Ergebnisse aus vier unabhängigen Versuchen wurden zu Mittelwerten zusammengefasst und sind mit dem korrespondierenden SEM dargestellt.

γδ T-Zellen wurden in Anwesenheit von IFN Typ I mit oder ohne Antigenstimulation inkubiert und CD69-Expression, IFN-γ-Produktion, Proliferation und lytische Aktivität zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. In Analogie zu den CpG-Stimulations-Versuchen zeigte sich, dass eine Steigerung all dieser Parameter durch Zugabe von IFN Typ I erreicht werden konnte (siehe Abb. 14). Entsprechende Experimente mit NK-Zellen ergaben ein ähnliches Bild (Daten nicht gezeigt).

Die Zugabe des Zytokins IL-12 bewirkte eine vergleichbare Aktivitätssteigerung beider Zelltypen (Daten nicht gezeigt). In Anwesenheit der untersuchten ODNs war bioaktives

IL-12 p70 in diesem Versuchsansatz jedoch nicht nachzuweisen (Proteinnachweis mittels ELISA, untere Detektionsgrenze 3,2 pg/ ml; Daten nicht gezeigt).

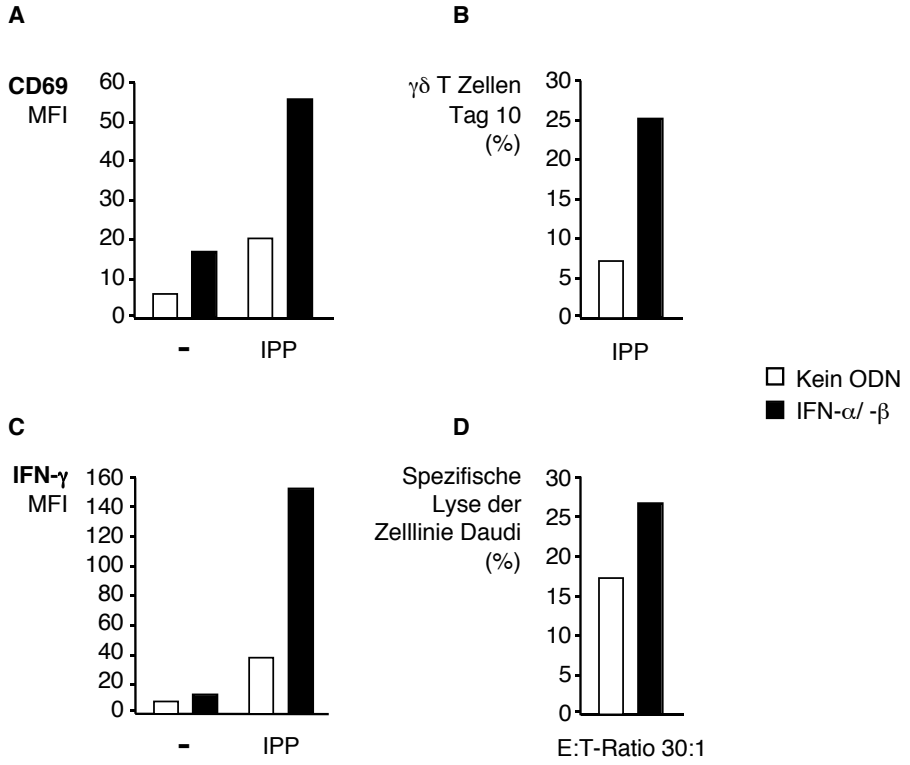


**Abb. 14 Rekombinantes IFN Typ I steigert im Synergismus mit Antigenstimulation die CD69-Expression, Proliferation, IFN-γ-Produktion und die lytische Aktivität von γδ T-Zellen**

PBMCs (2 x $10^6$/ ml) wurden mit rekombinantem IFN-α (5000 U/ ml) und IFN-β (500 U/ ml) mit oder ohne dem γδ T-Zell-Antigen IPP stimuliert. Die CD69-Expression wurde nach 48 h **(A)** und der intrazelluläre IFN-γ-Gehalt wurde nach 72 h **(C)** mit einer 4-Farben FACS-Analyse bestimmt. **B:** Der prozentuale Anteil von γδ T-Zellen an der Gesamtpopulation der T-Zellen wurde nach 10 Tagen bestimmt. **D:** Zusätzlich wurden γδT-Zellen aufgereinigt und anschließend entweder isoliert oder in einem Transwell-System mit autologen PBMCs (PBMC-Kontext) mit rekombinantem IFN-α (5000 U/ ml) und IFN-β (500 U/ ml) stimuliert. Nach drei Tagen wurden sie in einem $^{51}$Chrom-Lyse-Test als Effektorzellen in der E:T-Ratio von 30:1 eingesetzt. Als Zielzelle wurde die Daudi-Zelllinie verwendet. Die Abb. zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

### 3.2.2.8. Die Hemmung von IFN Typ I verhindert die synergistische Steigerung der γδ T-Zell-Aktivierung durch CpG-ODN

Da die im ELISA bestimmte Proteinmenge eines Zytokins nicht unbedingt mit seiner biologischen Aktivität korreliert, wurden zusätzlich Hemmungsexperimente durchgeführt, in denen die funktionelle Aktivität weiterer, potenziell involvierter Zytokine gehemmt wurde. Hierzu wurden ein IL-1-Rezeptorantagonist, ein IL-18-Bindungsprotein [Sugaya, 1999] bzw. neutralisierende Antikörper gegen IL-12 [Garcia, 1997], IL-15 [Garcia, 1998] und TNF-α eingesetzt.

Keine dieser blockierenden Reagenzien konnte die IPP- oder CpG-ODN-induzierte CD69-Expression auf γδ T-Zellen vermindern (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz hierzu war es möglich, durch die Kombination von neutralisierenden Antikörpern gegen IFN Typ I und einem IFN-Rezeptorantagonist, die durch ODN 1585/ 2216 hervorgerufene CD69-Expression zu vermindern (siehe Abb. 15A). Neben der CD69-Expression konnte durch die IFN Typ I-Hemmung eine Reduktion der ODN 1585/ 2216-induzierten IFN-γ-Produktion erreicht werden, wobei dies nicht für ODN 2006 galt (siehe Abb. 15B). Das durch IPP allein induzierte IFN-γ wurde durch die Blockierungsantikörper nicht vermindert, so dass eine Basisproduktion von IFN Typ I innerhalb von PBMCs nicht für die IFN-γ-Produktion von γδ T-Zellen verantwortlich gemacht werden konnte.

Anders verhielt sich die Situation für IL-12 und IL-18. Eine Hemmung der biologischen Aktivität dieser Zytokine verminderte zwar die IFN-γ-Produktion innerhalb von PBMCs, dennoch war in diesen Experimenten eine deutliche Steigerung der verminderten IFN-γ-Produktion durch CpG-Zugabe zu erreichen. Folglich sorgte in diesem Versuchsansatz eine CpG-unabhängige Grundproduktion dieser Zytokine für eine Verstärkung der IFN-γ-Produktion von γδ T-Zellen (Daten nicht gezeigt).

CpG-induziertes IFN Typ I konnte somit als die Ursache für die gesteigerte CD69-Expression respektive IFN-γ-Produktion von ODN 1585/ 2216-stimulierten γδ T-Zellen identifiziert werden.

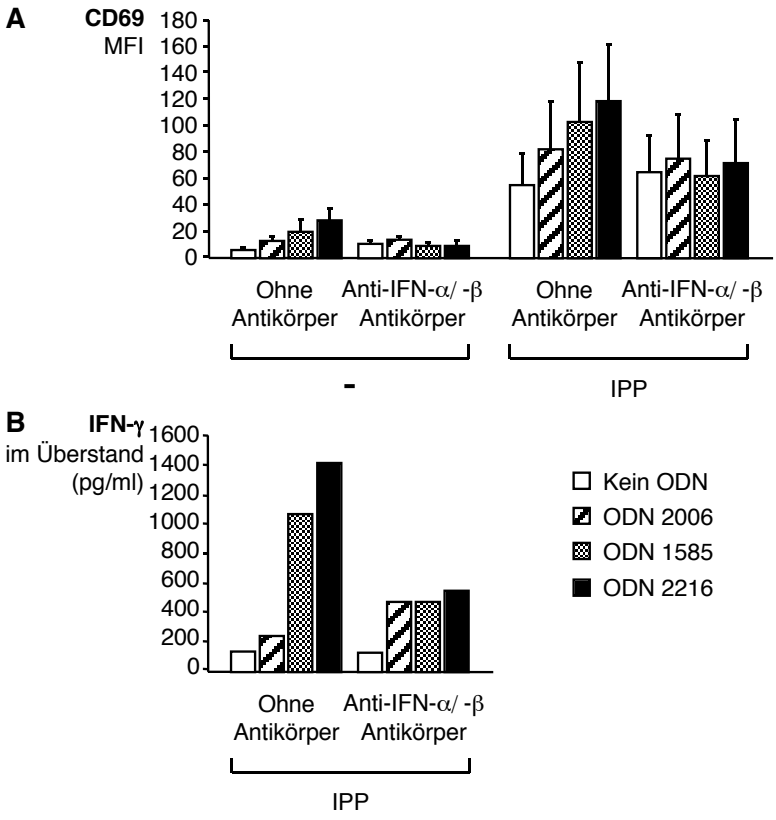


**Abb. 15 Die CpG-ODN-abhängige Aktivierung von γδ T-Zellen wird nur durch IFN Typ I vermittelt**

PBMCs (2 x $10^6$/ ml) wurden mit verschiedenen ODNs (6 µg/ ml) mit oder ohne dem γδ T-Zell-Antigen IPP inkubiert. Blockierende Reagenzien wurden zu Beginn der Kultur hinzugegeben. Die Wirkung von IFN Typ I wurde durch eine Kombination von Antikörpern gegen IFN-α (5000 neutralisierende U/ ml), gegen IFN-β (1000 neutralisierende U/ ml) und gegen die IFN Typ I–Rezeptor β-Kette (20 µg/ ml) blockiert. **A:** Nach 48 h wurde die CD69-Expression auf γδT-Zellen mit einer 4-Farben FACS-Analyse ermittelt (Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen + SEM). Analog dazu wurde nach 48 h IFN-γ im Überstand mittels ELISA bestimmt. Abb. **B** zeigt einen repräsentativen Versuch aus drei Versuchen mit ähnlichen Resultaten.

### *3.2.3. CpG-ODNs steigern synergistisch die Immunantwort von Antigen-stimulierten αβ T-Zellen*

Die eigenen Versuche hatten gezeigt, dass innerhalb von PBMCs durch Zugabe von CpG-ODNs eine Aktivierung von klassischen αβ T-Zellen im Gegensatz zu γδ T-Zellen und NK-Zellen nicht zu erreichen war (siehe oben). Die beobachtete CpG-begünstigte Generierung eines starken TH1-Zytokin-Millieus ließ jedoch annehmen, dass auch αβ T-Zellen im Kontext einer Antigenstimulation indirekt durch CpG-DNA synergistisch aktivierbar sind. *In vivo*-Experimente im murinen System hatten ferner eindeutig belegt, dass eine Antigen-spezifische αβ T-Zell-Immunantwort durch CpG-Stimulation deutlich steigerbar ist [Sun, 1998]. Weiterhin konnten andere Arbeitsgruppen für das humane System mittels *in vitro*-Versuchen darlegen, dass T-Zellen, die über ihren CD3-Korezeptor aktiviert wurden, in Anwesenheit von CpG-abhängigen Zytokinen zur Proliferation angetrieben wurden [Kranzer, 2000]. Eine genaue Differenzierung zwischen αβ T-Zellen und γδ T-Zellen war in diesen Experimenten jedoch nicht erfolgt, auch wurde das Zytokinprofil der aktivierten T-Zellen nicht näher bestimmt.

#### 3.2.3.1 Naive CD4+ T-Zellen werden in Anwesenheit von CpG-ODNs zu TH1-T-Zellen polarisiert

Die vorausgegangenen Experimente konnten eindeutig belegen, dass der beobachtete kostimulatorische CpG-Effekt auf γδ T-Zellen indirekt via lösliche Faktoren vermittelt war. Um der Frage nach einer analogen CpG-Wirkung auf stimulierte αβ T-Zellen nachzugehen, sollte folglich ein Versuchsansatz entwickelt werden, der eine indirekte Wirkung von CpG-ODN-induzierten löslichen Faktoren auf die Immunantwort humaner αβ T-Zellen zu untersuchen vermochte. In ersten Versuchen sollte hierbei insbesondere Augenmerk auf eine mögliche TH-Polarisierung von naiven αβ T-Zellen gelegt werden.

Hierzu wurden naive CD4+ T-Zellen zusammen mit CpG-ODN-stimulierten PBMCs durch ein Transwell getrennt inkubiert. Um eine Antigen-unabhängige, TH-neutrale und komplette Stimulation aller naiven CD4+ T-Zellen zu erreichen wurden sogenannte *T cell expansion microbeads* eingesetzt. Diese ca. 4,5 µm großen *microbeads* tragen an ihrer Oberfläche anti-CD3/ anti-CD28 Antikörper und simulieren somit einen maximalen TZR-Stimulus bei gleichzeitig starker Kostimulation. Durch die Inkubation in einem Transwell-System wurde ein direkter Zellkontakt der naiven CD4+ T-Zellen mit den CpG-ODN-stimulierten PBMCs ausgeschlossen. Durch diesen Versuchsaufbau

war ferner gewährleistet, dass es zu keiner Stimulation von TH-polarisierten T-Zellen innerhalb der PBMCs durch die anti-CD3/ anti-CD28 *microbeads* kam. Um letztlich den Einfluss der CpG-ODN-Stimulation auf die TH-Polarisierung der naiven T-Zellen zu untersuchen, wurde nach neun Tagen Kultur das Zytokinprofil der *microbeads*-stimulierten T-Zellen ermittelt. Hierzu wurde mittels PMA/ Ionomycin-Restimulation eine maximale Aktivierung der T-Zellen herbeigeführt und anschließend die IL-4 und IFN-γ-Produktion der CD4+ T-Zellen intrazellulär im FACS bestimmt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass durch Stimulation mit ODN 2216 maßgeblich mehr TH1-polarisierte T-Zellen generiert werden konnten als durch ODN 1585, ODN 2006 oder unstimulierte PBMCs (siehe Abb. 16).

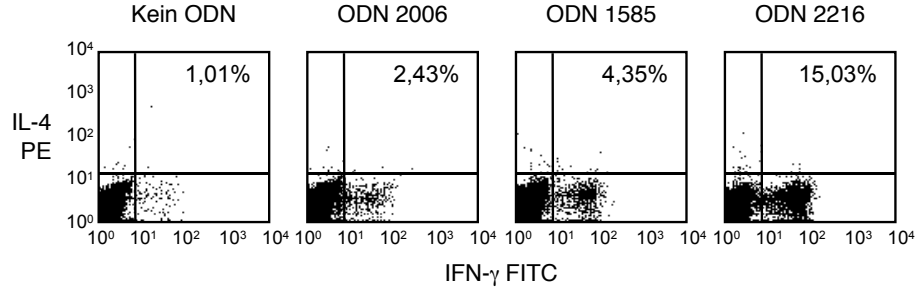


**Abb. 16 CpG-ODNs begünstigen eine TH1-Polarisierung von naiven CD4+ T-Zellen**

Isolierte naive CD4+ T-Zellen wurden mit anti-CD3/ anti-CD28 *microbeads* durch ein Transwell-System getrennt von PBMCs (2 x $10^6$/ ml) mit verschieden CpG-ODNs (ODN 2006, ODN 1585 und ODN 2216; alle zu 6 µg/ ml) inkubiert. Nach neun Tagen wurde der intrazelluläre IFN-γ bzw. IL-4-Gehalt in den CD4+ T-Zellen nach PMA/ Ionomycin-Restimulation in einer FACS-Analyse bestimmt. Die Werte im rechten oberen Quadranten entsprechen dem prozentualen Anteil an IFN-γ-positiven Zellen, der anhand einer Isotypkontrolle ermittelt wurde. Die Abb. zeigt das repräsentative Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen.

### 3.2.3.2. Etablierung eines Modells zur Untersuchung einer Peptid-spezifischen αβ T-Zell-Immunantwort

Um eine Antigen-spezifische CD8+ T-Zell-Immunantwort *in vitro* zu untersuchen, bedarf es einerseits einer Möglichkeit T-Zellen Antigen-spezifisch zu aktivieren, andererseits einer geeigneten Methode, diese Antigen-spezifischen T-Zellen zu detektieren, um letztlich eine Aussage über ihre Frequenz und ihren Phänotyp treffen zu können. Eine geeignete Methode bietet hier die Tetramertechnik, die es ermöglicht, MHC-I-restringierte CD8+ T-Zellen entsprechend ihrer Antigen-Spezifität im FACS zu visualisieren. Als Antigene lassen sich synthetisch hergestellte Peptide einsetzen, die CD8+ T-Zellen im MHC-Kontext präsentiert werden können. Für derartige T-Zell-Stimulationsexperimente bietet es sich aus praktischen Gründen an, auf Peptide zurückzugreifen, die von MHC-Molekülen präsentiert werden können, die, trotz des hohen Gen-Polymorphismus der MHC-Moleküle, in der zu untersuchenden Population weite Verbreitung finden. In den durchgeführten Experimenten wurden deshalb Peptide eingesetzt, die von dem MHC-I-Molekül des Typs HLA-A*0201 präsentiert werden können, da ca. ein Drittel der kaukasischen Bevölkerung Träger dieses MHC-Moleküls ist.

Im peripheren Blut erwachsener gesunder Spender exprimieren zirkulierende CD8+ T-Zellen in Abhängigkeit ihrer Antigen-Spezifität einen typischen Phänotyp. Zum Beispiel zeigen CD8+ T-Zellen, die spezifisch sind für das Melanom-assoziierte Differenzierungsantigen Melan-A/ MART-1, einen fast vollständig naiven Phänotyp. CD8+ T-Zellen, spezifisch für das Influenza-Matrix-Protein, weisen hingegen einen Antigen-erfahrenen Phänotyp auf und entsprechen somit sogenannten *memory* T-Zellen [Pittet, 1999; Zippelius, 2002]. In Anlehnung an diese Unterschiede wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene HLA-A*0201-restringierte Peptide als Modellantigene benutzt, um den Einfluss von CpG-DNA auf eine CD8+ T-Zell-Immunantwort zu untersuchen. Das vom Influenza-Matrix-Protein abstammende Peptid Flu matrix$_{58-66}$ (FLU) als Modell-Antigen für eine *recall*-Antwort; und das vom Melan-A-Protein abstammende Peptid Melan-A$_{26-35}$ A27L (MEL) als Modell für eine primäre Immunantwort. Das MEL-Peptid, welches an der zweiten Aminosäureposition von A→L substituiert ist, wurde eingesetzt, da es nachweislich eine höhere Immunogenität als sein natürliches Gegenstück besitzt [Valmori, 1998].

Wie vorher gezeigt wurde, sind im humanen peripheren Blut PDCs und B-Zellen die einzigen TLR9-exprimierenden Immunzellen und somit direkt reagibel auf

CpG-ODN-Stimulation. Monozyten, MDCs, T-Zellen und NK-Zellen werden hingegen nur indirekt über PDCs und B-Zellen aktiviert [Krug, 2001b; Hornung, 2002]. Um jedoch sowohl indirekte als auch direkte Effekte von CpG-DNA auf die Immunantwort Antigen-spezifisch stimulierter CD8+ T-Zellen nachzuweisen, wurden in vorliegender Arbeit nicht-separierte PBMCs als Zellpopulation untersucht. Ferner wurde die Frequenz CD8-positiver Zellen innerhalb von PBMCs auf ca. 30 - 40 % erhöht, um eine ausreichende Anzahl Antigen-spezifischer Präkursor-T-Zellen pro Versuchsansatz zu gewährleisten. Vor Peptidstimulation war die Frequenz Antigen-spezifischer CD8+ T-Zellen sowohl für das FLU- als auch für das MEL-Peptid in allen Spendern geringer als 0,2 %. Eine aktive Influenza-Infektion bzw. eine aktive Immunantwort gegen das Melan-A-Antigen konnte somit bei den anamnestisch gesunden Spendern ausgeschlossen werden.

Vorversuche hatten ergeben, dass eine Kulturdauer von 14 Tagen optimal dazu geeignet ist, um innerhalb von PBMCs Frequenzsteigerungen Antigen-spezifischer CD8+ T-Zellen durch Zugabe eines entsprechenden Peptids zu erreichen. Die Versuche wurden somit nach 14 Tagen beendet und die Frequenz Antigen-spezifischer CD8+ T-Zellen mittels Tetramer-Färbung und zusätzlich anhand der IFN-γ-Produktion nach Antigen-spezifischer Restimulation ermittelt. Ferner wurde bei manchen Spendern die Zytotoxizität der Peptid-spezifischen T-Zellen mittels eines $^{51}$Chrom-Lyse-Tests bestimmt. In allen Versuchen wurde für optimale Stimulationsbedingungen die Peptidkonzentration des MEL-Peptids auf 5$\mu$M und des FLU-Peptids auf 0,1 $\mu$M eingestellt.

#### 3.2.3.3. Beide CpG-ODN-Klassen steigern die Frequenz Antigen-spezifischer T-Zellen nach Stimulation mit einem *recall*-Antigen

PBMCs gesunder HLA-A*0201-positiver Spender wurden mit dem FLU-Peptid in Anwesenheit oder Abwesenheit der ODNs 2006, 1585 bzw. 2216 stimuliert und nach 12 - 14 Tagen die Frequenz Antigen-spezifischer CD8+ T-Zellen mittels Tetramer-Messung ermittelt (siehe Abb. 17A/ B). Im Vergleich zu einer alleinigen Peptid-Zugabe erhöhte die Anwesenheit aller getesteten CpG-ODNs signifikant die Frequenz FLU-Peptid-spezifischer CD8+ T-Zellen. Eine Zusammenfassung von 16 unabhängigen Versuchen ergab eine mittlere Frequenz von FLU-Peptid-spezifischen CD8+ T-Zellen von 12,2 % für ODN 2006, von 11,8 % für ODN 1585, von 10,8 % für ODN 2216 und von 5,8 % für die Kontroll-Kondition (siehe Abb. 17B). Ein signifikanter

Unterschied zwischen den drei CpG-ODNs war nicht zu ermitteln. Der Einsatz des GC-Kontroll-ODNs für ODN 2006 erbrachte keine Frequenzsteigerung Tetramer-positiver Zellen (siehe Abb. 17C), so dass der beobachtete Effekt CpG-Motiv-abhängig war.

Zusätzlich zu den Tetramer-Färbungen wurde die Anzahl IFN-γ-produzierender CD8+ T-Zellen nach FLU-Peptid-Restimulation ermittelt (siehe Abb. 17D obere Reihe). Ähnlich den Ergebnissen, die mit den Tetramer-Messungen erzielt wurden, zeigte sich, dass alle getesteten CpG-ODNs die Frequenz FLU-Peptid-spezifischer, IFN-γ-produzierender CD8+ T-Zellen erhöhte. Die Mittelung von 13 unabhängigen Versuchen zeigte eine Frequenz von 1,6 % IFN-γ+/ CD8+ T-Zellen ohne CpG-ODN, von 4,4 % mit Zugabe von ODN 2006, von 3,1 % mit ODN 1585 bzw. von 2,9 % mit ODN 2216 (siehe Abb. 17E). Um die FLU-Peptid-Spezifität der IFN-γ+/ CD8+ T-Zellen nachzuweisen, wurde jeweils mit einem irrelevanten, ebenfalls HLA-A*0201-restringiertem Kontroll-Peptid (HIV $pol_{476-484}$) restimuliert. Die hierbei gemessenen Frequenzen waren stets niedriger als 0,2 %, so dass falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen werden konnten (siehe Abb. 17D untere Reihe). Die Frequenz Peptid-spezifischer CD8+ T-Zellen, die mittels intrazellulärer IFN-γ-Messung ermittelt wurde, korrelierte mit den Tetramer-Daten, jedoch auf einem geringerem Niveau. Knapp ein Drittel aller Tetramer-positiven Zellen produzierte nach Peptid-Restimulation IFN-γ. Es zeichnete sich der Trend ab, dass in Anwesenheit von ODN 2006 der Anteil IFN-γ-produzierender Zellen in der Fraktion FLU-Peptid-spezifischer CD8+ T-Zellen höher war, jedoch war dieser Unterschied zu den anderen CpG-ODNs statistisch nicht signifikant.

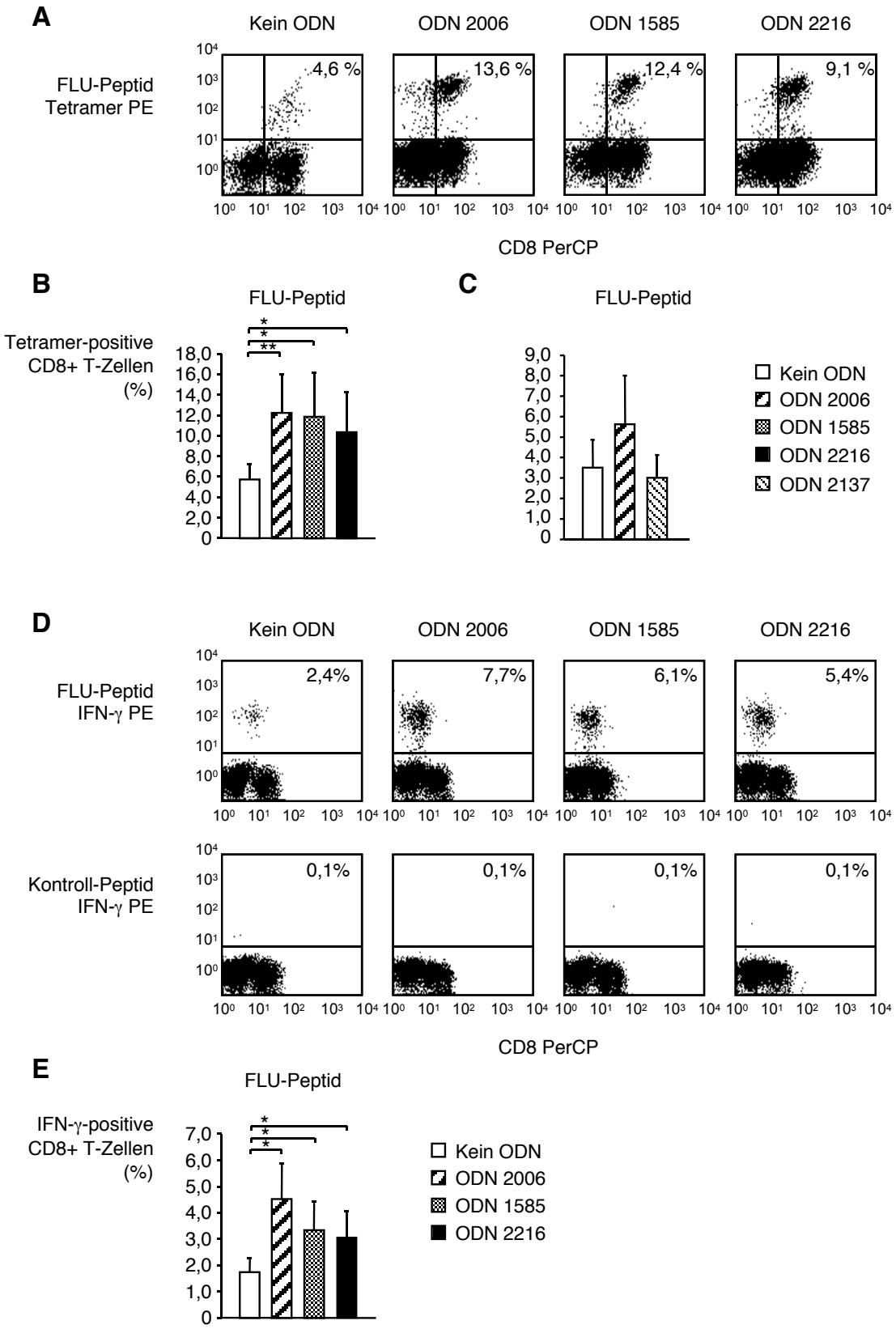
A
Kein ODN
ODN 2006
ODN 1585
ODN 2216
FLU-Peptid Tetramer PE
4,6 %
13,6 %
12,4 %
9,1 %
CD8 PerCP
B
FLU-Peptid
Tetramer-positive CD8+ T-Zellen (%)
C
FLU-Peptid
Kein ODN
ODN 2006
ODN 1585
ODN 2216
ODN 2137
D
Kein ODN
ODN 2006
ODN 1585
ODN 2216
FLU-Peptid IFN-γ PE
2,4%
7,7%
6,1%
5,4%
Kontroll-Peptid IFN-γ PE
0,1%
CD8 PerCP
E
FLU-Peptid
IFN-γ-positive CD8+ T-Zellen (%)
Kein ODN
ODN 2006
ODN 1585
ODN 2216

**Abb. 17 CpG-ODNs steigern synergistisch die Frequenz Influenza-Peptid-spezifischer, IFN-γ-produzierender CD8+ T-Zellen**

CD8+ T-Zellen (1 x $10^6$/ ml) von HLA-A*0201-positiven Spendern wurden mit verschiedenen ODNs (6 $\mu$g/ ml) und dem FLU-Peptid stimuliert. Autologe PBMCs (3 x $10^6$/ ml) wurden als APCs eingesetzt. Nach 14 Tagen Kokultur wurden die Zellen geerntet und in einer 4-Farben FACS-Analyse die Frequenz Antigen-spezifischer CD8+ T-Zellen mit Hilfe von Tetrameren bestimmt. In Abb. **A** ist das repräsentative Ergebnis eines Versuchs dargestellt. Der prozentuale Anteil Tetramer-positiver Zellen an der Gesamtheit der CD8+ T-Zellen ist jeweils im rechten oberen Quadranten abgebildet. 16 (B) respektive 2 (C) Versuche sind zu Mittelwerten in Abb. **B** bzw. **C** zusammengefasst. Die Fehlerbalken kennzeichnen den jeweiligen SEM.
Weiterhin wurden nach 14 Tagen die PBMCs mit ihrem ursprünglichem Peptid oder einem ebenfalls HLA-A*0201-restringiertem Kontroll-Peptid (HIV $pol_{476-484}$) restimuliert. Nach 6 h wurde IFN-γ intrazellulär in einer 4-Farben FACS-Analyse bestimmt. In der oberen Reihe der Abb. **D** ist das repräsentative Ergebnis eines Versuchs dargestellt, in dem das FLU-Peptid zur ursprünglichen Stimulation als auch zur Restimulation nach 14 Tagen verwendet wurde. Die untere Reihe der Abb. **D** zeigt das Ergebnis der Restimulation mit dem Kontroll-Peptid des gleichen Versuchs. Der prozentuale Anteil IFN-γ-positiver Zellen an der Gesamtheit der CD8+ T-Zellen ist jeweils im rechten oberen Quadranten dargestellt. 13 Restimulations-Versuche wurden zu Mittelwerten in Abb. **E** zusammengefasst, wobei die Fehlerbalken den jeweiligen SEM kennzeichnen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

### 3.2.3.4. Nur ODN 2006 steigert die Frequenz Antigen-spezifischer T-Zellen nach Stimulation mit einem Naiv-Antigen

Das MEL-Peptid wurde als Modell-Antigen gewählt, um das Priming naiver CD8+ T-Zellen zu untersuchen. Hierzu wurden ebenfalls PBMCs gesunder HLA-A*0201-positiver Spender mit dem MEL-Peptid in Anwesenheit oder Abwesenheit der ODNs 2006, 1585 bzw. 2216 stimuliert und nach 12 - 14 Tagen die Frequenz Antigen-spezifischer CD8+ T-Zellen mittels Tetramer-Messung ermittelt (siehe Abb. 18A/ B). Während alle CpG-ODNs die Expansion FLU-Peptid-spezifischer CD8+ T-Zellen förderten (siehe Abb. 17A und B), zeigte sich, dass lediglich durch ODN 2006 die Frequenz der MEL-Peptid-spezifischen CD8+ T-Zellen erhöht werden konnte. Dieser Effekt war wiederum CpG-Motiv-spezifisch (siehe Abb. 18C). Im Gegensatz dazu konnten ODN 1585 und 2216 die Frequenz der Antigen-spezifischen T-Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle nicht erhöhen. Die Zusammenfassung der Tetramer-Messungen von 16 unabhängigen Versuchen erbrachte eine Frequenzsteigerung der MEL-Peptid-spezifischen CD8+ T-Zellen von 1,1 % in der Kontrollbedingung auf 2,4 % mit Zusatz von ODN 2006, auf 1,4 % mit ODN 1585 bzw. keine Veränderung mit ODN 2216 (siehe Abb. 18B). In Übereinstimmung mit den Tetramer-Ergebnissen zeigte sich eine Zunahme der IFN-γ+/ CD8+ T-Zellen nach MEL-Peptid-Restimulation von 0,5 % ohne CpG auf 1,5 % mit ODN 2006, auf 0,5 % mit ODN 1585 und auf 0,4 % mit ODN 2216 (siehe Abb. 18D).

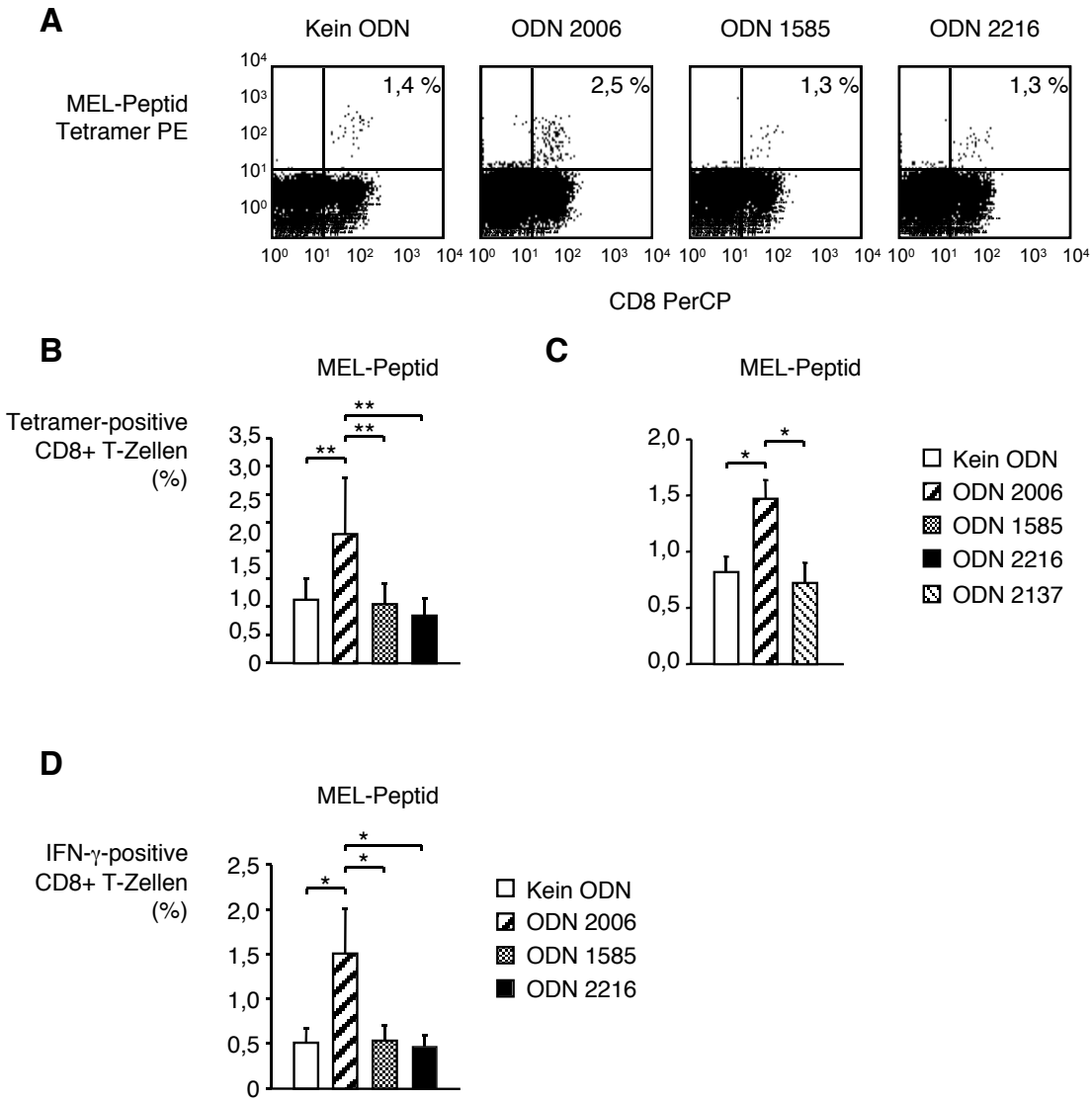


**Abb. 18 Nur CpG-ODN 2006 steigert synergistisch die Frequenz Melan-A-Peptid-spezifischer, IFN-γ-produziernder CD8+ T-Zellen**

CD8+ T-Zellen (1 x $10^6$/ ml) von HLA-A*0201-positiven Spendern wurden mit verschiedenen ODNs (6 $\mu$g/ ml) und dem MEL-Peptid stimuliert. Autologe PBMCs (3 x $10^6$/ ml) wurden als APCs eingesetzt. Nach 14 Tagen Kokultur wurden die Zellen geerntet und in einer 4-Farben FACS-Analyse die Frequenz Antigen-spezifischer CD8+ T-Zellen mit Hilfe von Tetrameren bestimmt. In Abb. **A** ist das repräsentative Ergebnis eines Versuchs dargestellt. Der prozentuale Anteil Tetramer-positiver Zellen an der Gesamtheit der CD8+ T-Zellen ist jeweils im rechten oberen Quadranten dargestellt. 16 (B) respektive 3 (C) Versuche sind zu Mittelwerten in Abb. **B** bzw. **C** zusammengefasst. Die Fehlerbalken kennzeichnen den jeweiligen SEM.
Weiterhin wurden nach 14 Tagen die PBMCs mit ihrem ursprünglichem Peptid oder einem ebenfalls HLA-A*0201-restringiertem Kontroll-Peptid (HIV $pol_{476-484}$) restimuliert. Nach 6 h wurde IFN-γ intrazellulär in einer 4-Farben FACS-Analyse bestimmt. Zwölf Restimulations-Versuche wurden zu Mittelwerten in Abb. **D** zusammengefasst, wobei die Fehlerbalken den jeweiligen SEM kennzeichnen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Wurden HLA-A*0201-restringierte Peptide des HIV pol- oder HIV gag-Proteins als Modell-Antigene benutzt, um ebenfalls eine primäre Immunantwort zu simulieren, so konnten weder mit Tetramer- noch mit IFN-γ-Messungen Peptid-spezifische CD8+ T-Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Vorläuferfrequenz naiver CD8+ T-Zellen, spezifisch für diese HIV-Peptide, schien zu gering zu sein, um ein effizientes Priming in diesem *in vitro*-Ansatz zu ermöglichen.

### 3.2.3.5. In Anwesenheit von CpG-ODNs generierte T-Zellen exprimieren einen zytotoxischen, enddifferenzierten Phänotyp

Eine effektive zytotoxische Immunantwort ist sowohl von der Quantität als auch der Qualität der CD8+ T-Zellen abhängig. So haben Untersuchungen gezeigt, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* expandierten Antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen Effektor-Funktion und Zytotoxizität fehlen können [Lee, 1999; Jager, 2002]. Mehrere Vakzinierungsstudien, in denen von Tumorantigenen abgeleitete Peptide eingesetzt wurden, haben gezeigt, dass bestimmte Phänotypmerkmale der T-Zellen mit dem Differenzierungsgrad in Richtung Effektorzellen korrelieren. Eine Herunterregulation der Marker CD28 und CD45RA und eine Hochregulation des Aktivierungsmarkers *signaling lymphocytic activation molecule* (SLAM) scheinen demnach einer Differenzierung in Richtung Effektorzelle zu entsprechen [Azuma, 1993; Cocks, 1995; Borthwick, 2000]. Ferner wurde berichtet, dass die Expression von CD56 mit einer erhöhten zytotoxischen Aktivität *ex vivo* korreliert [Pittet, 2000].

Um zu untersuchen, ob CpG-DNA nicht nur die Frequenz Antigen-spezifischer CD8+ T-Zellen erhöht, sondern auch den Phänotyp der generierten Zellen beeinflusst, wurde die Expression der Oberflächenmarker CD45RA, CD28, CD56 und SLAM jeweils auf FLU-Peptid-spezifischen bzw. unspezifischen CD8+ T-Zellen bestimmt. Im Vergleich zu den FLU-unspezifischen CD8+ T-Zellen zeigten die FLU-positiven CD8+ T-Zellen eine geringere Expression von CD45RA (Daten nicht gezeigt) und CD28 und gleichzeitig eine höhere Expression von SLAM (siehe Abb. 19A und B). Die Antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen exprimierten somit einen Phänotyp, der vereinbar war mit dem Stadium enddifferenzierter Effektorzellen. Ein signifikanter Unterschied in der Expression der genannten Phänotypmarker konnte bei dem Vergleich der verschiedenen ODN-Stimulationsansätze jedoch nicht festgestellt werden (siehe Abb. 19B). Anders verhielt es sich mit der Expression von CD56, einem Marker, der mit erhöhter zytotoxischer Aktivität *ex vivo* korreliert [Pittet, 2000]. Während sich die

Expressionshöhe von CD56 zwischen den Antigen-spezifischen und Antigen-unspezifischen CD8+ T-Zellen in der Bedingung ohne CpG-ODN-Zusatz nicht signifikant unterschied ($p = 0,29$), induzierte die ODN-Zugabe eine signifikant höhere Expression dieses Markers ($p < 0,01$). Die verschiedenen CpG-ODNs unterschieden sich deutlich in ihrer Wirksamkeit, die Expression von CD56 auf den Antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen zu steigern, wobei ODN 2216 das potenteste ODN darstellte. Die Unterschiede zwischen den eingesetzten ODNs stellten sich als signifikant heraus ($p < 0,01$ für den Unterschied zwischen ODN 2006 und ODN 2216 und $p = 0,05$ für den Unterschied zwischen ODN 2006 und ODN 1585, siehe Abb. 19C). Experimente, in denen die GC-Kontrolle für die ODNs 2006 und 2216 eingesetzt wurden, bewiesen wiederum eine CpG-Spezifität dieses Phänomens (siehe Abb. 19D). Analoge Veränderungen wurden in geringerer Ausprägung auch auf Melan-A-spezifischen CD8+ T-Zellen gesehen (Daten nicht gezeigt).

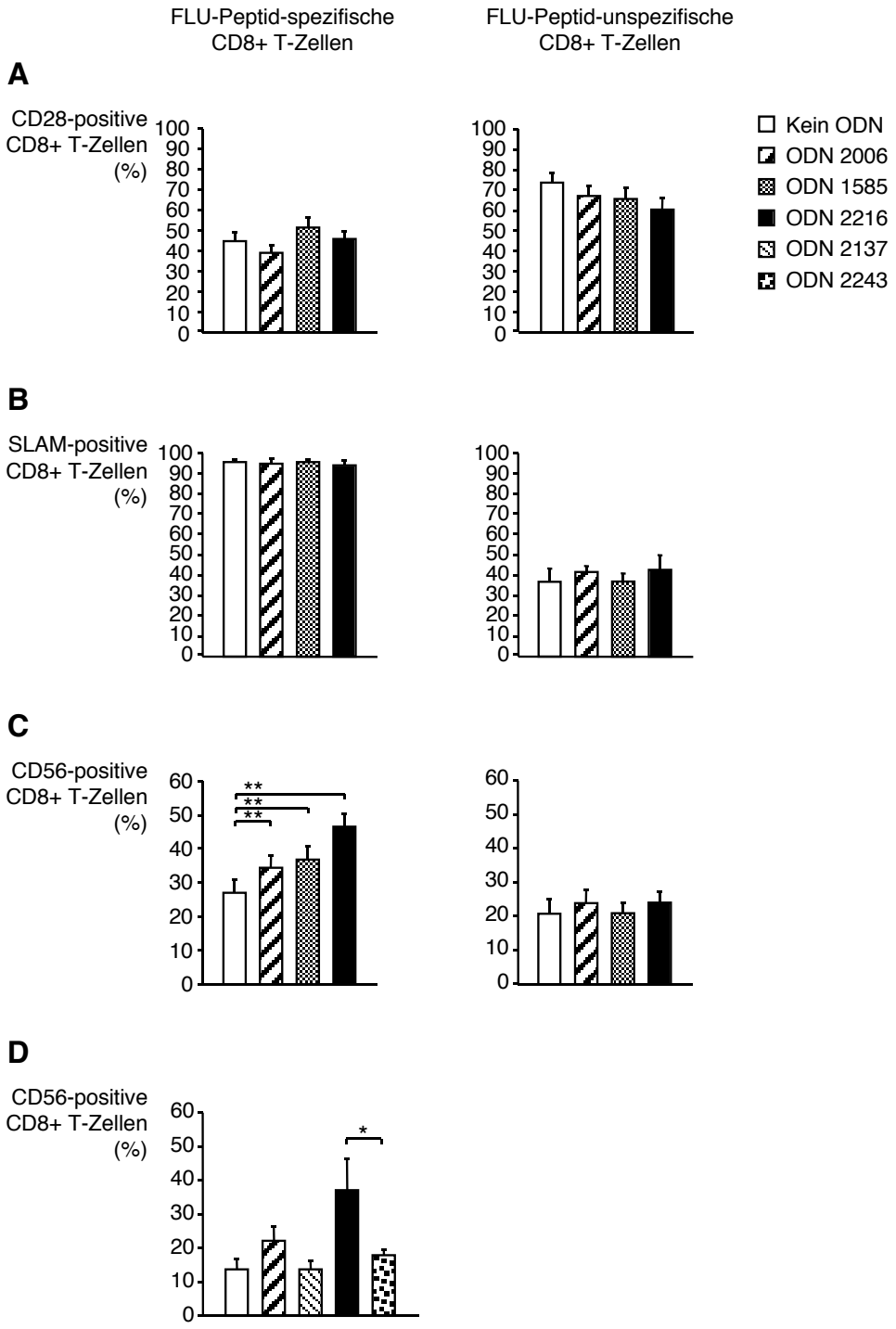


**Abb. 19 In Anwesenheit von CpG-ODNs generierte T-Zellen exprimieren einen zytotoxischen, enddifferenzierten Phänotyp**

CD8+ T-Zellen (1 x $10^6$/ ml) von HLA-A*0201-positiven Spendern wurden mit verschiedenen ODNs (6 $\mu$g/ ml) und dem FLU-Peptid stimuliert. Autologe PBMCs (3 x $10^6$/ ml) wurden als APCs eingesetzt. Nach 14 Tagen Kokultur wurden die Zellen geerntet und in einer 4-Farben FACS-Analyse der Phänotyp Tetramer-positiver CD8+ T-Zellen im Vergleich zu Tetramer-negativen CD8+ T-Zellen analysiert. In der Abb. ist die mittlere Expression von CD28 (**A**; n = 14), SLAM (**B**; n = 6) als auch CD56 (**C/ D**; n = 14/ 3) zusammengefasst. Auf der linken Seite sind die Phänotyp-Daten der FLU-Peptid-unspezifischen CD8+ T-Zellen, auf der rechten Seite die Ergebnisse der FLU-Peptid-spezifischen CD8+ T-Zellen dargestellt. Die Fehlerbalken kennzeichnen den jeweiligen SEM (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

3.2.3.5. Die durch CpG-ODNs gesteigerte Frequenz spezifischer T-Zellen korreliert mit einer erhöhten Zytotoxizität

Jüngste Arbeiten haben gezeigt, dass *in vitro* generierte Antigen-spezifische CD8+ T-Zellen trotz Expression eines zytotoxischen Phänotyps nicht fähig waren, ihr spezifisches Ziel zu lysieren [Gilliet, 2002a]. Diese CD8+ T-Zellen scheinen mit sogenannten „regulatorischen T-Zellen“ identisch zu sein [Gilliet, 2002b]. Um auszuschließen, dass die mit diesem Versuchsansatz generierten Peptid-spezifischen CD8+ T-Zellen, trotz ihres eindeutigen zytotoxischen Phänotyps, keine zytolytische Aktivität besitzen, wurden zusätzlich $^{51}$Chrom-Lyse-Tests durchgeführt. Nach 14 Tagen Kokultur wurden bei manchen Spendern die PBMCs als Effektoren in einem Zytotox-Test gegen T2-Zellen eingesetzt, die entweder mit dem korrespondierendem Peptid oder einem Kontroll-Peptid beladen waren. In Übereinstimmung mit der erhöhten Frequenz Peptid-spezifischer CD8+ T-Zellen konnte eine erhöhte Lyse in denjenigen Ansätzen beobachtet werden, in denen CpG-ODN zu Beginn der Kokultur zugegeben war (siehe Abb. 20A und B).

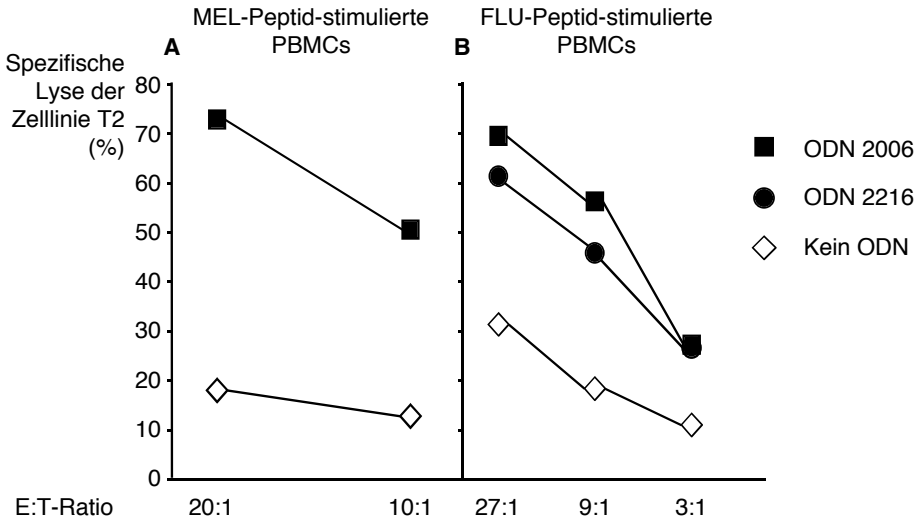


**Abb. 20 CpG-ODN steigert die Frequenz zytotoxischer, Antigen-spezifischer CD8+ T-Zellen**

CD8+ T-Zellen (1 x $10^6$/ ml) von HLA-A*0201-positiven Spendern wurden mit verschiedenen CpG-ODNs (ODN 2006, ODN 1585 und ODN 2216; alle zu 6 $\mu$g/ ml) und dem MEL-Peptid **A** bzw. dem FLU-Peptid **B** stimuliert. Autologe PBMCs (3 x $10^6$/ ml) wurden als APCs eingesetzt. Nach 14 Tagen Kokultur wurden die Zellen geerntet, gewaschen und anschließend in einem $^{51}$Chrom-Lyse-Test als Effektorzellen in der angegebenen E:T-Ratio eingesetzt. Als Zielzelle wurde jeweils die Peptid-gepulste T2-Zelllinie verwendet. Um eine Antigen-spezifische von einer Antigen-unspezifischen Lyse zu unterscheiden, wurde die Zielzelle entweder mit dem ursprünglichem Peptid oder einem Kontroll-Peptid gepulst. Die „unspezifischen“ Lysewerte wurden von den „spezifischen“ Lysewerten subtrahiert, um die spezifische Lyse zu erhalten. Ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

# 4. DISKUSSION

## 4.1. Übersicht über die experimentellen Befunde

Die genaue Analyse der TLR-Expression humaner Lymphozyten des peripheren Blutes hat gezeigt, dass lediglich die PDC und die B-Zelle TLR9 exprimieren. Konsequenterweise zeigte sich in funktionellen Untersuchungen, dass diese beiden Zellpopulationen im humanen Immunsystem die einzigen Zellpopulationen darstellen, die direkt durch CpG-Motiv-haltige ODNs aktiviert werden können. Andere Zellpopulationen wie Monozyten, MDCs, NK-Zellen und T-Zellen werden lediglich indirekt durch PDC-abhängige Zytokine stimuliert.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurden insbesondere die indirekten Effekte der CpG-Stimulation auf T-Zellen und NK-Zellen im humanen Immunsystem untersucht, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen skizziert werden sollten. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Klassen von CpG-ODNs, CpG-A und CpG-B, die sich in ihrer Struktur und Fähigkeit, IFN-$\alpha$ in PDCs zu induzieren, unterscheiden. CpG-A bewirkt, einer Virusinfektion vergleichbar, eine massive Induktion von IFN Typ I in PDCs. Über die Induktion von IFN-$\alpha$ und -$\beta$ kam es zu einer starken Aktivierung von NK-Zellen, einer Antigen-unabhängigen Teilaktivierung von Gedächtnis-CD8+ T-Zellen und ferner zu einer Förderung der Proliferation, IFN-$\gamma$-Produktion und lytischen Aktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen. In Analogie dazu ließen sich Antigen-erfahrene CD8+ T-Zellen durch CpG-A zu Proliferation und erhöhter Zytotoxizität stimulieren. Ein Priming von naiven CD8+ T-Zellen wurde in dem Peptid-Antigen-Modell dieser Arbeit durch CpG-A jedoch nicht erreicht.

Im Gegensatz dazu erwies sich CpG-B als potentes Adjuvans in der Expansion sowohl naiver als auch Antigen-erfahrener CD8+ T-Zellen. So konnten in dem Versuchsansatz dieser Arbeit durch den Einsatz dieser CpG-Klasse bis zu zwanzigfache Frequenzsteigerungen Antigen-spezifischer T-Zellen erreicht werden. Gemäß der geringen Induktion von IFN Typ I in PDCs wurden Effektorlymphozyten der angeborenen Immunität, wie NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen, sowie Antigen-erfahrene T-Zellklone, durch CpG-B nicht aktiviert. Eine schematische Übersicht zu den unterschiedlichen Effekten der zwei Klassen von CpG-ODNs zeigt Abb. 21.

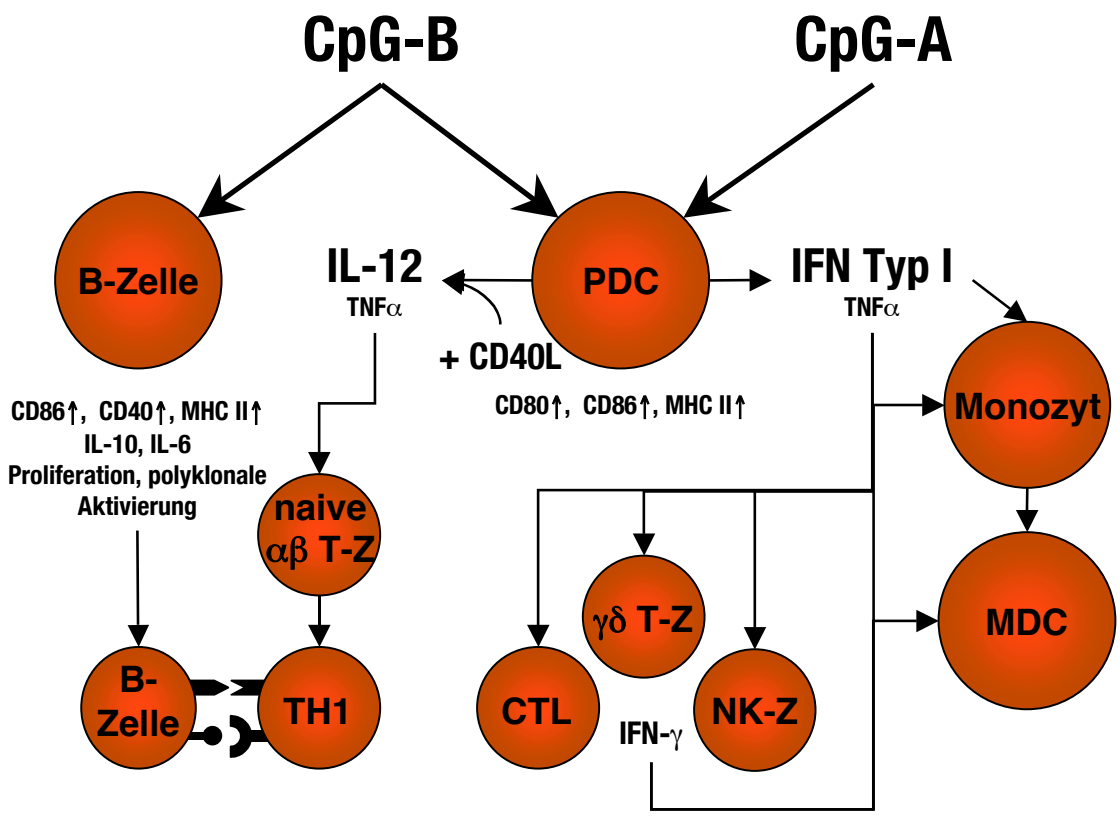


**Abb. 21 CpG-Effekte im humanen Immunsystem**

Die PDC und die B-Zelle werden direkt durch CpG-ODN stimuliert. Eine Stimulation anderer Immunzellen wie den Monozyten, MDCs, T-Zellen und NK-Zellen wird durch PDC-abhängige Zytokine vermittelt. CpG-A (Prototyp ODN 2216) induziert große Mengen IFN-α in PDCs. Durch PDC-abhängiges IFN-α stimuliert CpG-A NK-Zellen und γδ T-Zellen zur IFN-γ-Produktion. IFN-γ stimuliert wiederum zusammmen mit PDC-abhängigem IFN-α Monozyten und MDCs. Ferner wird durch IFN-α die Zytotoxizität von CTLs gesteigert. CpG-B (Prototyp ODN 2006) induziert im Synergismus mit CD40L eine IL-12-Produktion in PDCs, welche wiederum das Priming naiver T-Zellen mit sukzessiver Entwicklung in TH1-Zellen unterstützt. Diese TH1-Zellen führen in Kombination mit direkter Aktivierung von B-Zellen durch CpG-B zu einer starken humoralen Immunantwort.

## 4.2. Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur

### *4.2.1. Differenzielle TLR-Expression in Zellpopulationen des peripheren Blutes*

Die Immunantwort, die ein mikrobielles Molekül auslöst, wird bestimmt durch die Reaktionsmöglichkeiten der Zelle, die mit dem korrespondierenden Erkennungsmechanismus ausgestattet ist. Konsequenterweise ist die genaue Charakterisierung der Expressionsverteilung von PRRs auf Zellen des Immunsystems wichtig für das Verständnis von Pathogen-Wirt-Interaktionen und die darauf folgende Immunantwort. In Kenntnis der entsprechenden Liganden lässt die Expressionsanalyse unterschiedlicher PRRs auf Immunzellen Rückschlüsse auf die Funktion und mögliche

Stellung einer Zelle in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen zu. Da die Familie der TLRs unter den PRRs eine zentrale Rolle einnimmt, ist die Verteilung ihrer Rezeptoren von großem Interesse für die immunologische Forschung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Expression von TLR9 gerichtet, dem kürzlich beschriebenen Erkennungsrezeptor immunstimulatorischer DNA.

#### 4.2.1.1. TLR9-Expression korreliert mit direkter Sensitivität auf CpG-DNA

Ergebnissen dieser Arbeit zufolge zeigen innerhalb von PBMCs lediglich B-Zellen und PDCs eine nennenswerte Expression von TLR9, dem Rezeptor von CpG-DNA. In funktionellen Untersuchungen konnte dementsprechend gezeigt werden, dass PDCs und B-Zellen direkt durch CpG-DNA aktiviert werden, während hingegen NK-Zellen und T-Zellen nicht direkt auf CpG-Stimulation ansprechen. Unsere Arbeitsgruppe konnte für das humane System zusätzlich zeigen, dass auch aufgereinigte Monozyten und MDCs nicht direkt durch TLR9-Agonisten aktiviert werden können [Krug, 2001b; Hornung, 2002]. Dies ist im Einklang mit der Expressionsanalyse dieser Arbeit, die lediglich eine minimale Kopienzahl von TLR9 in diesen Zellen erfassen konnte. Diese Ergebnisse stehen jedoch im starken Gegensatz zu den Beobachtungen einer anderen Arbeitsgruppe, die mehrfach eine direkte CpG-vermittelte Aktivierung von Monozyten berichtete [Takeshita, 2001; Klinman, 2002]. Beim Vergleich dieser vordergründig widersprüchlichen Beobachtungen ist jedoch zu beachten, dass in den Aufreinigungsstrategien dieser Arbeitsgruppe keine explizite Depletion von PDCs vorgenommen wurde. Eigene Untersuchungen verdeutlichen jedoch, dass selbst geringe PDC-Fraktionen, auch in vermeintlich reinen Zellpopulationen, noch starke indirekte Effekte verursachen können. Die in dieser und auch anderen Arbeiten beobachtete marginale Expression von TLR9 in Monozyten lässt jedoch Raum für Spekulationen [Bauer, 2001b; Bourke, 2003]. So ist es denkbar, dass humane myeloide Zellen im Laufe eines Differenzierungsprozesses die funktionelle Expression von TLR9 erlangen, auch wenn zurzeit keine Hinweise in diese Richtung bestehen. So ist z.B. schon seit längerem bekannt, dass DCs, die aus Monozyten generiert wurden, nicht auf CpG-Stimulation reagieren [Hartmann, 1999b; Bauer, 2001b].

Interessanterweise zeigte sich in Stimulationsexperimenten, dass sowohl in B-Zellen als auch in PDCs eine rasche Herabregulation von TLR9 durch den korrespondierenden Agonisten ODN 2006 erzielt werden konnte. In PDCs wurde jedoch auch durch den Ausreifungsstimulus IL-3 eine ähnliche Expressionsverminderung dieses TLRs hervorgerufen. Folglich lässt sich dieses

Phänomen nicht als zusätzlichen Hinweis deuten, dass TLR9 an der Erkennung von CpG-DNA beteiligt ist. In Analogie hierzu wurde gezeigt, dass MDCs während des Ausreifungsprozesses sowohl durch LPS als auch durch TNF ihren PRR TLR4 herunterregulieren [Visintin, 2001]. Der in dieser und anderen Publikationen beobachtete progressive Verlust der TLR-Expression im Rahmen der DC-Maturierung unterstreicht, dass DCs einen funktionellen Wandel von PAMP-Erkennung zur Antigen-Präsentation durchschreiten [Thoma-Uszynski, 2000; Kadowaki, 2001b].
Im Widerspruch zu diesen Beobachtungen wurde in einer kürzlich erschienen Studie eine deutliche Induktion der TLR9-Expression in B-Zellen nach CpG-Stimulation nachgewiesen. Die Autoren dieser Arbeit propagierten folglich einen positiven Rückkopplungsmechanismus, über den CpG-DNA seine eigene Wirkung potenzieren könnte. Möglicherweise sind diese konträren Ergebnisse durch die unterschiedlichen Isolations- und Kulturmethoden bedingt, da sonst vergleichbare Versuchsbedingungen zur Anwendung kamen [Bourke, 2003].

#### 4.2.1.2. Vergleich des Expressionsmusters von TLRs in humanen Lymphozytensubpopulationen

Zu Beginn dieser Arbeit existierten bereits mehrere Publikationen, die sich mit der TLR-Expression in humanen Lymphozyten befassten. Diese Studien konzentrierten sich jedoch entweder nur auf die TLR-Expression einer speziellen Subpopulation oder es wurde lediglich die differenzielle Expression einzelner TLRs auf verschiedenen Subpopulationen untersucht [Jarrossay, 2001; Kadowaki, 2001b; Visintin, 2001]. Ferner kamen in diesen Studien Detektionsmethoden zur Anwendung, die nur semi-quantitative Aussagen über die Höhe der TLR-Expression zuließen. Somit konnte diese Arbeit durch das äußerst sensitive und exakte Verfahren der *real-time*-PCR die bis dato umfassendste und genaueste Expressionsanalyse der TLR-Familie in Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes erstellen. Diese Analyse beinhaltete den Vergleich der Expressionsmuster von mehreren gesunden Probanden und konnte somit zeigen, dass unterschiedliche Lymphozytenpopulationen konsistent charakteristische Profile an TLRs exprimieren.

In einer kürzlich erschienen Studie wurde mittels Northern-Blot die differenzielle TLR1-5-Expression in humanen Leukozytensubpopulationen untersucht [Muzio, 2000]. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten bestätigt und durch den Einsatz der sensitiveren Methode der *real-time*-PCR entscheident erweitert werden. So zeigte sich, dass die

Expression von TLR2 und TLR5 nicht nur auf Vetreter der myelomonozytären Stammreihe beschränkt ist, sondern dass auch NK-Zellen und T-Zellen diese TLRs exprimieren. Weiterhin konnten geringe Expressionslevel von TLR3 auf NK-Zellen nachgewiesen werden. PDCs waren jedoch eindeutig negativ für diesen TLR, so dass dieser PRR kein DC-spezifischer Marker zu sein scheint, wie von Muzio und Mitarbeitern angenommen [Muzio, 2000].

Im Einklang mit einer früheren Studie konnte eine prominente Expression von TLR1 und TLR6 auf Monozyten beobachtet werden. Zusätzlich zeigte sich, dass diese PRRs auch auf B-Zellen deutlich vertreten sind [Ozinsky, 2000]. B-Zellen exprimierten überdies interessanterweise als einzige Zellpopulation innerhalb von PBMCs hohe Level an TLR10. Es ist somit anzunehmen, dass B-Zellen eine exklusive Rolle in der Detektion korrespondierender PAMPs durch diesen Rezeptor zukommt. Die Identifikation eines Liganden für TLR10 könnte somit die interessante Möglichkeit eröffnen, innerhalb von PBMCs selektiv B-Zellen zu aktivieren.

Die beobachtete fehlende Expression von TLR3 und TLR5 in B-Zellen lässt weiterhin vermuten, dass korrespondierende PAMPs auf B-Zellen keine physiologische Rolle ausüben. Ferner deutet die marginale Expression von TLR4 in B-Zellen darauf hin, dass der TLR4-Agonist LPS in dieser Zellpopulation nicht über diesen Erkennungsmechanismus detektiert werden kann. Dies deckt sich mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die darlegen, dass in B-Zellen der TLR4-homologe Rezeptor RP105 exklusiv an der Erkennung von LPS beteiligt ist [Ogata, 2000].

#### 4.2.1.3. Differenzielle TLR-Expression auf dendritischen Zellen

In den letzten Jahren fand die Expression von PRRs auf professionellen APCs besondere Beachtung, zumal ihnen, als Schaltstellen zwischen angeborener und adaptiver Immunität, eine entscheidende Rolle im Immunsystem zukommt. Im humanen peripheren Blut lassen sich zwei DC-Populationen anhand der Expression von CD11c unterscheiden [Shortman, 2002]: die PDC (CD11c-) und die MDC (CD11c+). Allerdings ist zurzeit noch wenig hinsichtlich ihrer funktionellen Stellung im Immunsystem bekannt, so dass Erkenntnisse zu Unterschieden ihrer Erkennungsstrategien dahingehend wichtige Hinweise liefern können. In einer früheren Studie konnte unsere Arbeitsgruppe ein detailliertes TLR-Expressionsmuster der MDC skizzieren [Krug, 2001b], so dass nun zusammen mit den Daten der vorliegenden Arbeit ein Vergleich der differenziellen TLR-Expression von MDC und PDC möglich ist.

Interessanterweise zeigt sich hierbei ein komplementäres Expressionsmuster an TLRs: Während die PDC nur TLR7 und TLR9 exprimiert, ist auf der MDC ein breites Spektrum an TLRs verteten, welches TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 und TLR8 einschließt (TLR1 ist ubiquitär auf allen Lymphozytensubpopulationen vertreten). Monozyten zeigen ein der MDC ähnliches Repertoire an TLRs, wobei sie eindeutig negativ für die Expression von TLR3 sind. Dieser PRR ist somit selektiv auf MDCs des peripheren Blutes vertreten. Funktionelle Beobachtungen, die eine differenzielle Responsivität auf korrespondierende PAMPs belegen, untermauern die Daten der vorliegenden Expressionsanalyse (Für eine Zusammenfassung siehe [Kadowaki, 2002]). Die erstaunliche Exklusivität dieser beiden Zelltypen in ihrer Austattung mit Erkennungsmechanismen für mikrobielle Bestandteile gibt Raum für Spekulationen. Möglicherweise reflektiert die unterschiedliche PRR-Ausstattung eine „Arbeitsteilung“ in der Detektion von PAMPs, wofür es im Laufe der Evolution zur Etablierung zweier spezialisierter DC-Stammreihen gekommen ist. Welche physiologische Rolle diese differenzielle Verteilung von TLRs auf verschiedenen APCs letzten Endes spielt, ist noch nicht annähernd verstanden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass trotz der restringierten TLR-Verteilung ein bestimmtes Pathogen nicht nur selektiv von PDCs erkannt wird, sondern auch myeloide APCs simultan über multiple TLR-abhängige und unabhängige Mechanismen aktiviert. So könnte zum Beispiel ein Gram-negatives Bakterium TLR4-abhängig durch LPS MDCs aktivieren und gleichzeitig die bakterielle DNA in einem TLR9-vermittelten Mechanismus PDCs stimulieren. Versuche mit TLR-defizienten Mäusen werden entscheidende Hinweise liefern, um die physiologische Rolle einzelner TLRs in der Detektion von Mikroben genauer zu skizzieren.

#### 4.2.1.4. TLR-Expression auf NK-Zellen und T-Zellen

Die Rolle von PRRs auf Effektorzellen des Immunsystems ist bis dato wenig untersucht. Es wird vielfach angenommen, dass mikrobielle Stimuli wie z.B. LPS lediglich sekundäre, indirekte Effekte auf NK-Zellen oder T-Zellen ausüben und dadurch deren Aktivität beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass die Ergebnisse dieser Arbeit eine geringe, aber konsistente Expression einiger TLRs sowohl in T-Zellen als auch in NK-Zellen darlegen. Prominent war hierbei insbesondere die Expression von TLR5, der Erkennungsstruktur für Flagellin [Hayashi, 2001]. Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit eine funktionelle Relevanz dieser Beobachtungen nicht erbracht werden konnte, deutet jedoch eine kürzlich erschienene

Publikation in diese Richtung. Caramalho und Mitarbeiter konnten eine eindeutige TLR-Expression in primären T-Zellen der Maus nachweisen und ferner in Stimulationsexperimenten bestätigen, dass dieser Expression eine funktionelle Rolle zukommt. Interessanterweise wurde in dieser Studie eine differenzielle TLR-Expression auf T-Zellen in Abhängigkeit ihres Differenzierungsstadiums beobachtet. So zeigten lediglich regulatorische T-Zellen eine Expression von TLR4 und wurden in diesen Versuchen konsequenterweise durch LPS stimuliert. Weiterhin konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die regulatorische Fähigkeit dieser T-Zellen durch einen PAMP-Stimulus deutlich erhöht werden konnte.

Zusammenfassend deuten diese Beobachtungen an, dass PAMPs auch noch spät im Rahmen einer spezifischen Immunantwort eine modulierende Rolle auf Ebene der Zellen der adaptiven Immunität einnehmen könnten [Caramalho, 2003].

### *4.2.2. Erklärungsmodelle für die unterschiedliche Reaktionsweise verschiedener Antigen-präsentierender Zellen auf korrespondierende TLR-Liganden*

#### 4.2.2.1. Das Stimulus- und das *lineage*-Modell

Ein seit langem kontrovers diskutiertes Thema der Immunologie beschäftigt sich mit der Frage, ob die Immunantwort einer DC auf einen mirkobiellen Stimulus durch den PAMP-Stimulus selbst oder ihre *lineage*-Zugehörigkeit determiniert ist.

Erste funktionelle Untersuchungen stützten die Hypothese, dass die DC-*lineage* entscheidend die Antwort auf einen PAMP beeinflusst. So ließ sich in Stimulationsexperimenten primärer MDCs mit TLR4-Agonisten eine deutliche Induktion von IL-12 erreichen, während PDCs auf TLR9-Aktivierung große Mengen an IFN Typ I produzierten [Kadowaki, 2001b; Krug, 2001b; Ito, 2002]. Da die korrespondierenden TLRs jedoch komplementär auf diesen Zelltypen verteilt sind, war mit diesen Beobachtungen eine abschließende Beurteilung obiger Fragestellung nicht möglich. So konnten diese Daten nicht ausschließen, dass die Expression eines bestimmten PRRs und folglich sein spezifischer Agonist den Ausgang einer Immunantwort bestimmt.

Eine interessante Sonderstellung unter den PRRs nimmt TLR7 ein, da im humanen System beide DC-Subtypen diesen Rezeptor funktionell exprimieren. Eine Stimulation über diesen Rezeptor bietet somit die Möglichkeit, die Hypothese zu testen, ob die durch einen PAMP hervorgerufene Immunantwort durch den Stimulus selbst oder die korrespondierende Zielzelle bestimmt wird. Ito und Mitarbeiter konnten in einer kürzlich

erschienen Studie entscheidende Hinweise liefern, dass in der Tat eher die *lineage*-Zugehörigkeit der stimulierten Zelle die darauf folgende Immunantwort bestimmt. So wurde in ihren Experimenten durch den TLR7-Agonisten R-848 sowohl das Überleben als auch die kostimulatorische Fähigkeit von MDCs und PDCs gesteigert, die induzierten Zytokinprofile unterschieden sich jedoch deutlich. Während R-848 in PDCs selektiv IFN Typ I induzierte, wurden MDCs spezifisch zur Produktion von IL-12 angeregt [Ito, 2002]. Für CpG-DNA lassen sich diese Beobachtungen zusätzlich zumindest auf das murine System ausweiten, da hier die Expression von TLR9 nicht nur auf PDCs und B-Zellen beschränkt ist, sondern auch APCs myeloider Herkunft deutliche Mengen an TLR9 exprimieren [Hochrein, 2002]. In Analogie zu der oben erläuterten differenziellen Zytokinproduktion humaner DCs auf den TLR7-Agonisten R-848, induziert CpG in murinen MDCs IL-12 und in der murinen PDC IFN Typ I. Auch diese Beobachtung stützt somit wiederum die Hypothese, dass nicht der PAMP-Stimulus bzw. der korrespondierende TLR selbst, sondern die stimulierte Zelle über den Ausgang der Immunantwort entscheidet.

#### 4.2.2.2. Modulation der Immunantwort auf Ebene der TLR-Adapterproteine

Konvergiert womöglich die Stimulation unterschiedlicher PRRs auf einer Zielzelle stets in die Induktion des gleichen immunologischen Repertoires dieser Zelle? Experimente mit myeloiden Zellen zeigen, dass dies nicht der Fall ist. So kommt es bei Stimulation über TLR3 bzw. TLR4 zur Induktion deutlich divergierender Immunantworten, wie mehrere Arbeitsgruppen eindrücklich belegen [Doyle, 2002]. Neuere Publikationen konnten in der Tat zeigen, dass insbesondere die Familie der intrazytoplasmatischen TIR-Adaptermoleküle eine entscheidende Rolle in der Mannigfaltigkeit der durch TLR-Agonisten induzierten biologischen Antworten spielen (für eine Übersicht siehe [Imler, 2003]). Durch Rekrutierung unterschiedlicher Adaptermoleküle können verschiedene TLR-Agonisten eine differenzielle Genexpression in einem identischen Zelltyp bedingen. Manche TLR-Proteine beschränken sich jedoch nicht nur auf einen Interaktionspartner, sondern sind in der Lage, unterschiedliche Adapterproteine zu rekrutieren. Wie *Knock-out*-Untersuchungen in der Maus zeigen, scheint das Repertoire an TLR-Adapterproteinen zumindest für manche Zelltypen und TLR-Stimuli redundant zu sein. Dies erklärt auch, dass die funktionelle Blockade eines TLR-Adapterproteins nicht zum völligen Verlust des PAMP-Signals führen muss, sondern auch lediglich das Muster der Immunantwort modulieren kann [Horng, 2002].

Für die Signaltransduktion via TLR7 und TLR9 wird bis dato lediglich das universale Adapterprotein MyD88 verantwortlich gemacht. Auch der IL-1-Rezeptor rekrutiert ausschließlich dieses Adapterprotein zur Initiation seiner Signaltransduktionskaskade. Dennoch unterscheiden sich IL-1 einerseits und R848 bzw. CpG-DNA andererseits deutlich in ihrer Fähigkeit IFN Typ I in PDCs zu induzieren (eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Das lässt vermuten, dass zusätzliche Adapterproteine über TLR7 und TLR9 rekrutiert werden. Ein möglicher Interaktionspartner wäre hierbei das kürzlich beschriebene Adapterprotein TICAM-1 [Oshiumi, 2003] bzw TRIF [Yamamoto, 2002b]. Dieses Adapterprotein ist für die frühe Induktion eines sogenannten MyD88-unabhängigen *„antiviral gene program“* verantwortlich, das dem beobachteten Expressionsmuster CpG-aktivierter PDCs sehr ähnlich ist [Kawai, 2001; Doyle, 2002]. Überdies unterscheiden sich möglicherweise verschiedene TLR9-Agonisten in ihrer Fähigkeit zusätzliche Adaptermoleküle zu rekrutieren, was das Phänomen der unterschiedlichen CpG-Klassen erklären könnte (siehe unten).

Die Frage, ob die Immunantwort auf einen PAMP durch die *lineage*-Zugehörigkeit der korrespondierenden Zielzelle oder den Stimulus bzw. Rezeptor selbst determiniert ist, lässt sich somit nicht eindeutig beantworten. Wahrscheinlich ist, dass die Immunantwort auf mikrobielle Moleküle durch eine Kombination aus beiden Mechanismen reguliert wird.

### *4.2.3. Einfluss methodischer Aspekte auf CpG-Stimulationsexperimente*

Frühere Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen propagierten eine direkte Stimulation von humanen NK-Zellen [Iho, 1999; Verthelyi, 2001] und T-Zellen [Bendigs, 1999; Lipford, 2000a] durch CpG-DNA. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen jedoch, dass primäre NK- und T-Zellen, im Einklang mit ihrer marginalen TLR9-Expression, nicht direkt durch CpG-ODNs stimuliert werden. Wie lässt sich diese deutliche Diskrepanz in den Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen erklären?

Aufgrund unterschiedlicher experimenteller Systeme können manche dieser Studien *a priori* nicht direkt mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen werden. So kamen in manchen Untersuchungen CpG-A-ähnliche ODNs zur Anwendung, die zu einer starken, vermeintlich APC-unabhängigen Kostimulation CD3-aktivierter T-Zellen führten [Bendigs, 1999]. Im Laufe dieser Arbeit mussten diese ursprünglichen Berichte allerdings revidiert werden, zumal sich im Nachhinein die Effekte als CpG-unabhängig erwiesen. So ließ sich retrospektiv die vermeintlich starke Kostimulation durch die

flankierenden Basen der eingesetzten Oligonukleotide erklären [Hacker 2000; Lipford, 2000a].

Neben einer womöglich unspezifischen Stimulation durch die flankierenden Abschnitte der ODNs wurde jedoch in den meisten Studien [Bendigs, 1999; Iho, 1999; Lipford, 2000a] die wohl wichtigste Einflussgröße in den entsprechenden Experimenten nicht berücksichtigt – die PDC. Obwohl PDCs nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamtmenge der PBMCs ausmachen (0,1 % - 0,5 %), sind sie in der Lage, große Mengen IFN Typ I zu produzieren, [Cella, 1999] und stellen die Hauptquelle des CpG-induzierten IFN-$\alpha$ und -$\beta$ innerhalb von PBMCs dar [Bauer, 2001a; Kadowaki, 2001a; Krug, 2001a]. Konsequenterweise können in vermeintlichen reinen Zellpopulationen (99 %) geringe Mengen von PDCs (z.B. 0,1 %) für sekundäre CpG-Effekte verantwortlich gemacht werden. Da PDCs keine klassischen Marker der hämatopoetischen Zellreihen wie CD3, CD14 oder CD19 exprimieren, werden sie in typischen Depletionsstrategien zur Aufreinigung von NK-Zellen oder T-Zellen nicht aussortiert, sondern sogar meist zusätzlich angereichert (eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Ein analoges Problem stellt die geläufige Isolation von murinen T-Zellen anhand des Markers Thy1 [Lipford, 2000a] dar, zumal dieser Marker auf dem murinen Pendant zur humanen PDC exprimiert wird [Bjorck 2001]. Diesen Beobachtungen zufolge ist davon auszugehen, dass in den meisten Publikationen, in denen eine direkte CpG-Stimulation von primären NK-Zellen oder T-Zellen beobachtet wurde, eine „Verunreinigung“ der Zellpräparationen mit PDCs vorlag. Dies unterstreicht die bedeutende Rolle der PDC als „Schlüsselzelle“ der CpG-Erkennung im humanen System.

Eine mutmaßliche „PDC-Kontamination“ kann jedoch nicht die Ergebnisse von Klinman und Mitarbeitern erklären, die eine konsistente, direkte NK-Zell-Aktivierung durch CpG-DNA darlegen [Verthelyi, 2001; Gursel, 2002a]. In diesen Experimenten ließ sich die humane NK-Tumorzelllinie NK-92 durch CpG-ODNs der Kategorie CpG-A zu einer gesteigerten lytischen Aktivität und IFN-$\gamma$-Produktion anregen. Daten zur TLR-Expression dieser Zellen liegen nicht vor, jedoch ist es möglicherweise bei dieser Zelllinie im Rahmen der malignen Entartung zur Induktion einer TLR9-Expression gekommen, die somit ein Ansprechen auf CpG-DNA ermöglicht. Ferner ist nicht ausgeschlossen, dass die beobachteten Effekte durch eine CpG-Motiv-unabhängige Aktivierung der NK-92-Zelllinie durch die Poly-G-Enden der benutzten ODNs verursacht wurde, wie es für T-Zellen schon beschrieben ist [Hacker 2000; Lipford, 2000a]. So wurden in den NK-92-Stimulationsversuchen keine GC-ODN-Kontrollen

durchgeführt [Verthelyi, 2001], sondern lediglich mit ODNs der Kategorie CpG-B verglichen. Rückschlüsse aus diesen Ergebnissen auf eine direkte CpG-Sensitivität primärer humaner NK-Zellen erscheinen somit als fragwürdig.

### *4.2.4. CpG-DNA aktiviert indirekt Effektorzellen der angeborenen Immunität*

#### 4.2.4.1. Rolle der γδ T-Zelle in der CpG-vermittelten Antitumorwirkung

Seit der Erst-Beobachtung durch Tokunaga und Mitarbeiter [Tokunaga, 1984], dass mykobakterielle DNA NK-Zellen aktiviert und somit eine sukzessive anti-Tumor-Wirkung induziert, haben zahlreiche Studien die Bedeutung der NK-Zelle für die CpG-vermittelte Immunstimulation belegt. Ferner hat es sich gezeigt, dass im Rahmen der CpG-Stimulation die frühe IFN-γ-Produktion den entscheidenden Faktor in der Etablierung eines TH1-Zytokinmilieus und sukzessiven Generierung einer adaptiven zytotoxischen Immunantwort darstellt [Krieg, 1998a]. Diese frühe IFN-γ-Freisetzung wurde bis dato ausschließlich NK-Zellen zugeschrieben. Zur Typisierung dieser Zellpopulation wurden jedoch Marker herangezogen (CD56+/ CD4-/ CD8-), die auch einen beträchtlichen Anteil an γδ T-Zellen einschließen. γδ T-Zellen zeigen den Phänotyp sogenannter „natürlicher Gedächtniszellen“, Hinweis auf die chronische Antigen-Restimulation, der sie unterliegen. Trotz ihres TZRs exprimieren sie eine Reihe von Rezeptoren und Funktionen, die charakteristisch für NK-Zellen sind. Somit sind sie in der Lage auf NK-Zell-typische Signale mit NK-Zell-ähnlichen Effektorfunktionen zu antworten, die retrospektiv fälschlicherweise oft klassischen NK-Zellen zugeordnet wurden. Auf Grund ihrer hohen Frequenz und breiten Reaktivität spielen γδ T-Zellen jedoch eine wichtige Rolle zu Beginn einer Immunantwort, bevor „klassische“ B-Zellen oder T-Zellen in ausreichenden Zahlen zum Ort des Geschehens rekrutiert werden. Diesen Eigenschaften zufolge stellen γδ T-Zellen eine wichtige Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar. Auch wenn für γδ T-Zellen und NK-Zellen viele überlappende Eigenschaften in der Orchestrierung einer TH1-Immunantwort beschrieben wurden, so belegen neuere Untersuchungen, dass γδ T-Zellen eine entscheidende Schlüsselrolle in der frühen Phase der angeborenen Immunantwort zukommt. So scheinen aktivierte γδ T-Zellen notwendig zu sein um eine ausreichende IFN-γ-Synthese von NK-Zellen zu ermöglichen, was wiederum eine effektive adaptive TH1-Immunantwort nach sich zieht [Ferrick, 1995; Ladel, 1996]. Neben ihrer Fähigkeit relativ rasch TH1-polarisierende Zytokine zu produzieren, scheinen jedoch γδ T-Zellen auch durch direkten Zellkontakt

entscheidenden Einfluss auf die Generierung einer adaptiven Immunantwort zu nehmen. So zeigen jüngste Untersuchungen sowohl im murinen [Leslie, 2002] als auch im humanen [Ismaili, 2002] System, dass aktivierte γδ T-Zellen durch direkten Zellkontakt unreife MDCs zur Ausreifung bringen und somit eine TH1-gerichtete T-Zellantwort induzieren.

Interessanterweise wurden unabhängig voneinander sowohl immunstimulatorische DNA als auch die ersten Phosphoantigene für Vγ9-Vδ2 T-Zellen aus BCG-Extrakten gewonnen. Dies lässt vermuten, dass eine synergisitsche Aktivierung von γδ T-Zellen sowohl durch Phosphoantigene als auch durch bakterielle DNA zu der starken anti-Tumorwirkung von BCG beigetragen hat.

Diese Beobachtungen machen γδ T-Zellen zu einem wichtigen Faktor in der rationalen Entwicklung einer TH1-gerichteten Immuntherapie. Erste Ansätze mit sogenannten Kombinations-Vakzinen, die sowohl γδ T-Zellen als auch αβ T-Zellen stimulieren scheinen im Tierversuch vielversprechende Resultate zu zeigen. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge könnte der rationale Einsatz einer Kombination von spezifischen γδ T-Zell Antigenen mit CpG-DNA ein aussichtsreicher Ansatz sein, um die Schlüsselrolle der γδ T-Zelle im frühen Stadium einer Immunantwort therapeutisch zu nutzen.

#### 4.2.4.2. IFN Typ I aktiviert γδ T-Zellen

Bis dato haben zahlreiche Publikationen γδ T-Zellen eine bedeutende Rolle in der Abwehr viraler Infektionen zugeschrieben (für eine Übersicht siehe [Wallace, 1995]). Hierbei wird ihre Aufgabe primär in der Übergangsphase zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort gesehen. Durch ihre Virus-spezifische Antigen-Erkennung und prompte Effektorfunktion sollen γδ T-Zellen hierbei den Zeitraum zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort überbrücken. Verblüffenderweise wurde in den meist murinen Virusinfektionsmodellen nie ausdrücklich die Rolle von Interferonen des Typ I untersucht, obwohl diese Zytokine erwiesenermaßen eine Schlüsselrolle in viralen Infektionen einnehmen. Auch *in vitro*-Versuche hatten bis dato keine Hinweise ergeben, dass γδ T-Zellen durch IFN Typ I aktiviert werden.

Der in dieser Arbeit für die Aktivierung von γδ T-Zellen gezeigte Synergismus von IFN Typ I und TZR-Stimulation via IPP ist, unabhängig von der Tatsache, dass in diesem System IFN Typ I durch CpG-A induziert wurde, ein entscheidender

teleologischer Hinweis auf die vielfach postulierte Rolle von γδ T-Zellen in der Abwehr viraler Infektionen.

#### 4.2.4.3. CpG-A stimuliert Effektorzellen via Interferon Typ I

Aus der vorliegenden Arbeit führen drei unabhängige Beweiswege auf IFN Typ I als Mediator der CpG-A-vermittelten Effekte auf γδ T-Zellen und NK-Zellen. (1) Eine Kombination aus rekombinantem IFN-α und IFN-β vermochte ein CpG-A-analoges Aktivierungsmuster auf γδ T-Zellen und NK-Zellen hervorrufen. (2) Die Aktvierungsstärke der unterschiedlichen ODNs korrelierte mit ihrer Fähigkeit IFN Typ-I in PBMCs zu induzieren (ODN 2006 < ODN 1585 < ODN 2216). (3) Eine funktionelle Blockierung von IFN Typ I verhinderte fast vollständig die CpG-vermittelten Effekte auf γδ T-Zellen und NK-Zellen.

Analoge Beobachtungen konnten bei den Versuchen mit αβ CD8+ T-Zellen gemacht werden. Auch wenn die Expansion Antigen-erfahrener CD8+ T-Zellen durch CpG-ODNs beider Klassen gleichermaßen gesteigert wurde, zeigten sich wiederum Unterschiede in der biologischen Aktivität der verschiedenen ODNs, die mit ihrer Fähigkeit IFN Typ I zu induzieren einher gingen. CpG-A expandierte selektiv Antigen-erfahrene T-Zellen und induzierte einen Phänotyp, der mir hoher lytischer Aktivität korrelierte. So zeigten sich deutliche Unterschiede in der CD56-Expression expandierter Gedächtnis-T-Zellen und in der Zytotoxizität Antigen-stimulierter T-Zellklone in Abhängigkeit der benutzten CpG-ODNs (ODN 2006 < ODN 1585 < ODN 2216). Ein eindeutiger Beweis der IFN Typ I-Abhängigkeit dieser Resultate konnte leider nicht erbracht werden, da eine sehr große Menge blockierender Antikörper von Nöten gewesen wäre diesen Nachweis zu führen.

Diese Beobachtungen passen gut in das Konzept, dass IFN Typ I insbesondere Immunantworten von aktivierten und Antigen-erfahrenen T-Zellen fördert bzw. aufrecht erhält. *In vivo* wird dieser gesteigerte Umsatz insbesondere durch eine IFN Typ I-vermittelte Induktion von IL-15 in Zellen der myeloiden Stammreihe erreicht [Tough, 1996; Sun, 1998; Zhang, 1998; Marrack, 1999; Sun, 2000; Yajima, 2002]. Eigene Untersuchungen konnten in der Tat eine CpG-A-abhängige Induktion der IL-15-Transkription innerhalb von PBMCs nachweisen. In isolierten PDCs wurde eine Expressionsteigerung dieses Zytokins durch CpG-A jedoch nicht erreicht (Daten nicht gezeigt). Die Produktion großer Mengen von IFN-α durch PDCs könnte somit indirekt

eine wichtige Rolle in der gesteigerten Expansion von Influenza-spezifischen Gedächtniszellen durch CpG-A spielen.

Weiterhin ist bekannt, dass IFN-$\alpha$ in der Lage ist, die Zytotoxizität aktivierter CD8+ T-Zellen und NK-Zellen zu erhöhen [Biron, 1999; Biron 2001]. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Förderung des Gedächtnis-T-Zell-*turnovers* sind diese Effekte jedoch direkt durch IFN Typ I bedingt. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind die entsprechenden CpG-A-vermittelten Beobachtungen dieser Arbeit auf eine direkte Wirkung des IFN Typ I zurückzuführen.

### *4.2.5. Mögliche Mechanismen der unterschiedlichen Wirkprofile im Hinblick auf die Induktion einer adaptiven Immunantwort*

Eine definitive Erklärung für die funktionellen Unterschiede in der Förderung Antigen-spezifischer Immunantworten durch die zwei CpG-Klassen, insbesondere die deutlichen Unterschiede zwischen ODN 2006 und ODN 2216 im Priming von naiven CD8+ T-Zellen konnten die vorliegenden Ergebnisse nicht liefern.

Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass molekulare Eigenschaften der untersuchten Peptid-Antigene Einfluss auf die unterschiedlichen Immunantworten der Melan-A-spezifischen bzw. der Influenza-Matrix-spezifischen CD8+ T-Zellen hatten. Die Unterschiede in der beobachteten Immunantwort lassen sich eher auf die verschiedenen Differenzierungsstadien der reagierenden T-Zellen zurückführen, wobei die Melan-A-spezifischen T-Zellen einen naiven Phänotyp tragen, während die Influenza-Matrix-spezifischen T-Zellen vom Gedächtnis-Phänotyp sind. Diese Hypothese, der Abhängigkeit der biologischen Antwort vom Differenzierungsstadium der T-Zelle, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Melan-A-spezifische T-Zell-Klone, die einer Melan-A-spezifischen Gedächtniszelle entsprechen, durch CpG-A aktiviert werden, naive Melan-A-spezifische CD8+ T-Zellen jedoch nicht [Hornung, 2002].

#### 4.2.5.1. Welche Antigen-präsentierende Zelle stimuliert die T-Zellen?

Welche APC in dem hier untersuchten System innerhalb der PBMCs die Peptide präsentiert und die notwendige Kostimulation den Peptid-spezifischen CD8+ T-Zellen bietet, ist zurzeit noch unklar. Innerhalb von PBMCs sind PDCs die einzigen professionellen APCs, die direkt durch CpG aktiviert werden, so dass primär sie als

Vermittler der beobachteten Effekte in Frage kommen. Interessanterweise zeigten jedoch eigene Versuche, in denen aufgereinigte PDCs als Antigen-präsentierende Zellen eingesetzt wurden, deutlich geringere Frequenzen an Antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen im Vergleich zu Experimenten, in denen PBMCs als APCs eingesetzt wurden (Daten nicht gezeigt). Mit großer Wahrscheinlichkeit sind in diesem Versuchsansatz somit andere Zelltypen für die Antigenpräsentation und Kostimulation zumindest mitverantwortlich.

CpG-B induziert indirekt MDCs zur Expression kostimulatorischer Moleküle [Krug, 2001b] und aktiviert direkt B-Zellen zur Produktion proinflamatorischer Zytokine [Hartmann, 2000a; Bohle, 2001]. Auch CpG-A stimuliert Monozyten, B-Zellen und MDCs indirekt über PDC-produzierte Zytokine [Hartmann, 1999b; Gursel, 2002b; Hornung, 2002]. Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass sich innerhalb von PBMCs Monozyten durch CpG-Stimulation zu DC-ähnlichen Zellen differenzieren lassen. Dieser Prozess wurde indirekt durch CpG-A-abhängiges IFN Typ I erreicht und führte zu einer hohen IL-15-Produktion der Monozyten. In funktionellen Untersuchungen zeichneten sich diese CpG-A-Mono-DCs durch die selektive Förderung einer CD8+ Gedächtnis-T-Zell-Antwort aus, während das Priming von naiven T-Zellen nicht gesteigert wurde [Krug, 2003]. Da das dort untersuchte Modell dem Versuchsansatz dieser Arbeit sehr nahe kommt, ist es durchaus denkbar, dass zumindest für die beobachteten CpG-A-Effekte indirekt aktivierte Monozyten als APCs verantwortlich sind.

#### 4.2.5.2. Interferon inhibiert das Priming naiver T-Zellen

Neben dem Zell-Zellkontakt der APCs mit den CD8+ T-Zellen, spielt auch der direkte Effekt CpG-induzierter Zytokine auf die T-Zellen eine entscheidende Rolle. So wurde von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, dass IFN-$\alpha$ insbesondere auf naive T-Zellen einen starken anti-proliferativen Effekt ausübt, indem nach TZR-Stimulation der Übergang in die Synthese-Phase des Zellzykluses verhindert wird [Erickson, 1999]. Der genaue Mechanismus dieser ungleichen Wirkung von IFN-$\alpha$ auf naive T-Zellen im Vergleich zu den bereits beschrieben Wirkungen auf Gedächtnis-T-Zellen wird zurzeit noch nicht vollkommen verstanden. Eine differenzielle Expression des IFN-Rezeptors auf verschiedenen T-Zell-Populationen wurde bis dato nicht publiziert, auch ergaben eigene Messungen diesbezüglich keinen entscheidenden Hinweis. Möglicherweise spielen Unterschiede in der IL-15-Rezeptorexpression, des Aktivitätsprofils

unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren und der Chromatinstruktur eine wichtige Rolle hinsichtlich der konträren Effekte von IFN Typ I auf naive und Gedächtnis-T-Zellen [Agarwal, 1998].

Weiterhin propagieren mehrere Arbeitsgruppen, dass IFN Typ I die IL-12-Produktion aktivierter Monozyten und MDCs nachhaltig inhibiert [McRae, 2000; Byrnes, 2001]. Interessanterweise konnte vor kurzem in einem murinen Virus-Infektionsmodell gezeigt werden, dass die IFN Typ I-Produktion muriner PDCs die IL-12-Produktion von MDCs inhibierte [Dalod, 2002]. Auch eine PDC-abhängige IL-12-Produktion ließ sich durch einen autokrinen Rückopplungseffekt via IFN Typ I hemmen [Dzionek, 2002]. Wie in vielen Publikationen gezeigt wurde, ist IL-12 jedoch wichtig, wenn nicht sogar essenziell, um ein effektives Priming von TH1-T-Zellen durch DCs zu erreichen. Infektionsmodelle im murinen System lassen zwar vermuten, dass IFN-$\alpha$ IL-12 in der Induktion einer T-Zellantwort in Teilen ersetzten kann, doch stehen analoge Beobachtungen für das humane Immunsystem noch aus [Cousens, 1999]. Möglicherweise ist im Zusammenspiel von IL-12 und IFN Typ I die Konzentration von IFN-$\alpha$ ein entscheidender Faktor, zumal IFN-$\alpha$ die Expression des IL-12-Rezeptors auf T-Zellen induziert. Hohe IFN-$\alpha$-Konzentrationen, wie sie z.B. durch CpG-A induziert werden, könnten IL-12-vermittelte Effekte durch eine komplette Drosselung der IL-12-Produktion aufheben. Niedrige IFN Typ I-Konzentrationen (CpG-B) hingegen, könnten jedoch einen synergistischen Effekt durch die Hochregulation des IL-12-Rezeptors haben [Biron 2001]. Interessanterweise ließ sich in eigenen Versuchen kein bioaktives IL-12 in CpG-stimulierten PBMCs nachweisen. Jedoch konnte in PBMCs, die über ein CD40-stimulierendes Signal aktiviert wurden, eine deutliche IL-12-Produktion induziert werden, welche sich durch zusätzliche Gabe von CpG-B synergistisch steigern ließ. Die Anwesenheit von CpG-A, aber auch die Zugabe von rekombinantem IFN-$\alpha$/ -$\beta$, reduzierte dagegen die IL-12-Induktion unter den Kontrollwert. Auch wenn eine genaue Analyse der zu Grunde liegenden Mechanismen noch aussteht, spielt mit hoher Wahrscheinlichkeit IFN Typ I eine entscheidende Rolle in der beobachteten IL-12-Inhibition.

Zusammenfassend könnten somit zwei unabhängige, jedoch gleichzeitig IFN-abhängige Mechanismen erklären, warum es in dem untersuchten System zu keinem Priming naiver CD8+ T-Zellen durch CpG-A kam. Wahrscheinlich hatte einerseits die hohe IFN Typ I-Konzentration eine direkte, anti-proliferative Wirkung auf naive T-Zellen, andererseits wurde möglicherweise eine notwendige IL-12-Produktion durch IFN Typ I verhindert.

*4.2.6. Zwei verschiedene CpG-Klassen – charakterisiert durch ihre primären Zielzellen*

Im Vergleich unterschiedlicher immunstimulatorischer ODNs konzentrierte sich diese Arbeit auf funktionelle Unterschiede zweier kürzlich beschriebener CpG-Klassen. Das Hauptaugenmerk wurde hierbei auf die Aktivierung von Effektorzellen der angeborenen Immunität und die Induktion einer adaptiven Immunantwort gerichtet. Wie weiter oben ausführlich dargelegt lassen sich die hierbei beobachteten Unterschiede letztendlich auf sekundäre Effekte zurückführen, da T-Zellen und NK-Zellen CpG-DNA nicht direkt detektieren können. Im Gegensatz hierzu sind PDCs und B-Zellen aufgrund ihrer exklusiven Expression von TLR9 mit großer Sicherheit in humanen PBMCs die primären Zielzellen für CpG-DNA. Eine Klassen-Einteilung der CpG-ODNs in CpG-A und CpG-B anhand dieser primären Zielzellen, wie von A. Krieg und unserer Arbeitsgruppe vorgeschlagen (siehe Einleitung), erscheint damit sinnvoll.

Das Phänomen der unterschiedlichen CpG-Klassen beinhaltet zwei voneinander abgrenzbare Komponenten. Die unterschiedlichen biologischen Profile der zwei CpG-Klassen sind einerseits bedingt durch das unterschiedliche „immunologische Repertoire“ der B-Zelle und der PDC, hervorgerufen durch den identischen TLR9-Agonisten CpG-DNA, andererseits durch die vermeintlich präferenzielle Aktivierung dieser beider Zielzellen durch CpG-B bzw. CpG-A. Die genaue Charakterisierung der zwei CpG-Klassen im Hinblick auf die Aktivierung ihrer primärer Zielzellen wirft jedoch folgende entscheidende Fragen auf. Wieso kommt es durch CpG-A zur präferenziellen Aktivierung der PDC und nicht der B-Zelle, obwohl beide Zelltypen TLR9 exprimieren? Wie kommt es zu der qualitativ unterschiedlichen Antwort der PDC auf die beide am TLR9 ansetzenden Agonisten CpG-B bzw. CpG-A?

4.2.6.1. Nur CpG-B stimuliert die B-Zelle

Die Notwendigkeit von TLR9 in der Erkennung beider CpG-Klassen wurde erst kürzlich unter Beweis gestellt. Akira und Mitarbeitern gelang der eindeutige Nachweis, dass TLR9-defiziente Mäuse weder durch CpG-A noch durch CpG-B stimuliert werden können [Hemmi, 2003]. Dass diese Beobachtung jedoch nicht den Umkehrschluss zulässt, dass die Expression von TLR9 hinreichend ist, um auf CpG-DNA-Stimulation zu reagieren, deuten eigene Ergebnisse an. So reagieren aufgereinigte B-Zellen, trotz eindeutiger TLR9-Expression nicht auf CpG-A-Stimulation [Hartmann, 2003]. Auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass B-Zellen lediglich auf CpG-B-Stimulation ansprechen [Gursel, 2002a]. Weiterhin offenbaren Untersuchungen mit

TLR9-exprimierenden Zelllinien, dass diese lediglich durch ODNs der Kategorie CpG-B stimuliert werden können, während CpG-A nur geringe Effekte zeigt [Gursel, 2002a; Gursel, 2002b]. Diese Daten legen nahe, dass neben TLR9 akzessorische Faktoren notwendig sind, um auf ODNs der Kategorie CpG-A zu reagieren. Womöglich sind es diese zusätzlichen Erkennungsmechanismen, die für die selektive Aktivierung der PDC durch CpG-A verantwortlich sind.

#### 4.2.6.2. CpG-A und CpG-B induzieren eine qualitativ unterschiedliche Antwort der PDC

Die deutlich höhere Induktion von IFN Typ I durch CpG-A im Vergleich zu CpG-B suggeriert einen rein quantitativen Unterschied in der stimulatorischen Fähigkeit der beiden CpG-Klassen. Überraschenderweise haben jedoch Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass CpG-B in der Induktion zahlreicher DC-typischer Aktivitätsmarker CpG-A deutlich überlegen ist. Folglich sollte eher von qualitativ unterschiedlichen Aktivitätsprofilen die Rede sein. Im Vergleich zu CpG-A induziert CpG-B in PDCs eine deutlich höhere Expression von kostimulatorischen Molekülen und führt überdies zu einer stärkeren Produktion von proinflammatorischen Mediatoren [Krug, 2001b]. Auch zeigen sich zwischen den beiden ODN-Klassen deutliche Unterschiede in den Mechanismen der IFN Typ I-Induktion. So wird lediglich durch CpG-A ein positiver Rückkopplungsmechanismus benutzt, der die Interferonproduktion entscheidend amplifiziert [Kerkmann, 2003].

Grundsätzlich ist es denkbar, dass Unterschiede in Aufnahme, Prozessierung und/oder Bindung an den Rezeptor für die differierenden biologischen Aktivitäten der zwei CpG-ODN-Klassen verantwortlich sind. Im Folgenden seien kurz verschiedene Erklärungsmöglichkeiten dieses Phänomens skizziert.

#### 4.2.6.3. Strukturelle Unterschiede der beiden CpG-Klassen

Unveröffentlichten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe nach spielt unter Umständen die Ausbildung von Quartärstrukturen eine entscheidende Rolle in der unterschiedlichen Wirkung dieser beiden CpG-Klassen. Hinweise liefert die Größenauftrennung der unterschiedlichen ODNs auf einem Polyacrylamidgel. Hier lassen sich nur bei ODNs der Klasse CpG-A Banden nachweisen, die auf eine höhermolekulare Strukturbildung schließen lassen. CpG-B ODN zeigt hingegen ein einheitliches Laufverhalten auf dem Gel, da es lediglich als Monomer vorliegt.

Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop bestätigen diese Vermutungen. Während durch ODNs der Kategorie CpG-A partikuläre Strukturen gebildet werden, die in einem Größenbereich von 40 - 60 nm liegen, sind ODNs der Kategorie CpG-B nur in einzelsträngiger Form vorzufinden. Die Ausbildung dieser Strukturen scheint hierbei insbesondere abhängig zu sein von der Präsenz flankierender Poly-G-Abschnitte und zusätzlich dem Vorhandensein einer zentralen Palindromsequenz. Vermutlich stellen diese Abschnitte reaktive Zentren dar, die die Bildung von inter- und intramolekularen Bindungen des CpG-A-ODNs begünstigen. Interessanterweise korreliert die Fähigkeit dieser ODNs, höhermolekulare Strukturen zu bilden, mit ihrer Fähigkeit, IFN-$\alpha$ in PDCs zu induzieren. Wird die Komplexbildung durch Modifikation der zentralen Palindromsequenz respektive der flankierenden Poly-G-Abschnitte verhindert, geht die stimulatorische Wirkung des CpG-A-ODNs komplett verloren [Krug, 2001a]. Verleiht man hingegen CpG-B-ODN durch Bindung an Nanopartikel eine partikuläre Struktur, so wird ebenfalls eine maximale IFN-$\alpha$-Induktion in PDCs erreicht. In all diesen Experimenten ist die Präsenz eines CpG-Motivs notwendige Voraussetzung, um eine stimulatorische Aktivität auf PDCs auszuüben.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass die differierende biologische Aktivität der zwei CpG-Klassen durch Unterschiede in der Ausbildung höhermolekularer Komplexe bedingt ist. Diese Tatsache sollte folglich in Ansätzen, die die Existenz der unterschiedlichen CpG-Klassen untersuchen bzw. erklären, eine zentrale Stellung einnehmen.

#### 4.2.6.4. Differenzielle Aufnahme als Ursache der beiden CpG-Klassen?

Ein attraktives Erklärungsmodell wäre eine jeweils präferenzielle Aufnahme der verschiedenen CpG-Klassen in ihre korrespondierenden Zielzellen. Schon länger ist jedoch bekannt, dass Bindung und Aufnahme von Oligonukleotiden unabhängig von ihrer immunstimulatorischen Wirkung stattfindet, wobei die Präsenz von flankierenden Poly-G-Abschnitten für diese Prozesse eher förderlich zu sein scheint [Krieg 2002]. In einer kürzlich erschienen Studie wurden Bindung und Aufnahme der zwei CpG-Klassen in primären B-Zellen untersucht [Gursel, 2002a]. Obwohl sich hierbei eine verstärkte Bindung und Aufnahme von CpG-A in B-Zellen zeigte, wurde jedoch im Einklang mit eigenen Beobachtungen eine minimale Aktivierung von B-Zellen beobachtet. Eine verminderte Aufnahme von CpG-A ODN in B-Zellen scheidet somit als Grund für die beobachtete Areaktivität auf diese CpG-Klasse aus. Untersuchungen

zur differenziellen Aufnahme von CpG-ODNs in PDCs liegen nicht vor, doch bestehen indirekt Hinweise aus Versuchen unserer Arbeitsgruppe, dass auch für diese Zellpopulation keine quantitativen Unterschiede vorliegen.

In diesem Zusammenhang sind Mikroskopie-Studien der Arbeitsgruppe um Klinman von Interesse, in denen gezeigt wird, dass die zwei ODN-Klassen in unterschiedliche subzelluläre Kompartimente aufgenommen werden. Möglicherweise kommt es ausgehend von diesen unterschiedlichen Kompartimenten zur Initiation differierender Signaltransduktionsmechanismen. Statt eines quantitativen Aufnahme-Unterschieds könnte eher ein „qualitativer" Unterschied in der Aufnahme Ursache für die beobachteten Profile der zwei CpG-Klassen sein. Zukünftige Studien werden zeigen, ob tatsächlich eine unterschiedliche subzelluläre „Adressierung" der beiden CpG-Klassen für die beobachteten Unterschiede verantwortlich gemacht werden kann. Hierbei wird es insbesondere von Interesse sein, welche Mechanismen eine solche differenzielle Aufnahme bedingen.

#### 4.2.6.5. Scavengerrezeptor-A als Bindungspartner von CpG-A?

Wie oben dargelegt könnte die wahrscheinlich unterschiedliche Quartärstruktur der zwei ODN-Klassen bei diesem Prozess eine Rolle spielen. Aus funktionellen Untersuchungen lässt sich für ODNs der Kategorie CpG-A ableiten, dass mindestens vier Guanosinbasen an den jeweiligen Enden für maximale Aktivität notwendig sind [Verthelyi, 2001]. Computersimulationsmodelle lassen vermuten, dass diese Sequenzfolgen eine G-Quartett-Bildung der ODNs hervorrufen, für die wiederum eine Bindung an Scavenger-Rezeptoren des Typs A (SR-A) beschrieben ist. Die Präsenz von G-Quartett-Strukturen auf der Oberfläche von CpG-A-Partikeln könnte somit spezifisch zu einer SR-A-vermittelten Aufnahme in entsprechende Zellen führen.
In diesem Zusammenhang konnten Lee und Mitarbeiter zeigen, dass CpG-haltige Poly-G-ODNs über den SR-A aufgenommen werden und eine Zytokinproduktion in SR-A-exprimierenden DCs induzieren [Lee, 2000]. Eine Inhibition der SR-A-vermittelten Aufnahme der Poly-G-ODNs verhinderte in diesen Untersuchungen die Zytokinproduktion. Interessanterweise konnten wiederum andere Arbeitsgruppen zeigen, dass SR-A-*Knock-out*-Mäuse normal auf CpG-B-Stimulation reagieren. Leider wurden in diesen Experimenten ODNs der Klasse A nicht untersucht, so dass die Rolle der Scavenger-Rezeptoren noch nicht eindeutig geklärt ist [Zhu, 2001].

Die Expression von Scavenger-Rezeptoren auf PDCs ist bis dato nicht untersucht, könnte jedoch entscheidende Hinweise auf die beobachtete differenzielle CpG-Klassen-Erkennung von PDCs und B-Zellen geben. Neben einer möglicherweise „qualitativ“ unterschiedlichen Aufnahme in verschiedene subzelluläre Kompartimente könnten ferner unterschiedliche Bindungseigenschaften der zwei ODN-Klassen an TLR9 eine Modulation der folgenden Signaltransduktionskaskade vermitteln.

#### 4.2.6.6. Formierung unterschiedlicher Rezeptorkomplexe

Transmembranrezeptoren können auf zwei grundsätzlich verschiedenen Wegen ihr korrespondierendes Signal auslösen: (1) Die Ligandenbindung kann zu einer Multimerisierung des Rezeptors führen, welche ausreicht, um eine Signaltransduktionskaskade einzuleiten. Zytokinrezeptoren wie der GM-CSF-Rezeptor funktionieren auf diese Weise. Durch Bindung von GM-CSF kommt es zur Dimerisierung zweier Rezeptorketten und sukzessive zur Initiation der entsprechenden Signaltransduktionskaskade [Guthridge, 1998]. (2) Die Ligandenbindung kann zur Anordnung eines Multi-Rezeptorkomplexes führen, bei dem neben dem spezifischen Rezeptor viele weitere Komponenten zu dem folgenden *signalling* beitragen. So sind zum Beispiel am aktiven TZR-Komplex, neben den zwei spezifischen Rezeptorketten, mehr als acht zusätzliche Transmembranproteine beteiligt, die eine Feinmodulation des eingehenden Signals ermöglichen [Werlen, 2002]. Informationen über Affinität, Bindungsdauer und Kostimulation werden von diesem Rezeptorkomplex integriert und entscheiden so über Zelltod, Anergie oder Aktivierung der korrespondierenden Zelle. Über die Initiation der Signaltransduktion via TLRs ist bis dato wenig bekannt, jedoch bestehen Hinweise, dass beide Prinzipien der Rezeptoraktivierung in der TLR-Familie „zur Anwendung“ kommen.

#### 4.2.6.7. Partikuläre CpG-Strukturen könnten ein *clustering* von TLR9 induzieren

Für manche TLR-Agonisten ist beschrieben, dass sie durch Rezeptorbindung zu einer Hetero- oder Homodimerisierung der entsprechenden TLR-Moleküle führen und somit der Signaltransduktionsprozess ausgelöst wird [Underhill 2003]. Diese Beobachtungen lassen sich gut mit der nahen Verwandschaft der TLR-Familie zu dem IL-1-Rezeptor vereinen, der ebenfalls über Dimerisierung sein Signal auslöst. Experimentell lässt sich der Prozess der Dimerisierung und die Initiation der Signaltransduktionskaskade unter

anderem durch TLR-verknüpfende Antikörper künstlich nachstellen. Je höher die Dichte der TLR-Aggregation, desto stärker scheint hierbei das jeweils vermittelte Signal zu sein [Latz, 2002]. Hierbei muss die Verstärkung des eingehenden Signals nicht nur für quantitative Unterschiede verantwortlich sein, sondern kann überdies auch qualitativ differierende Antworten zur Folge haben.

Ein ähnliches Szenario ist für TLR9 denkbar: Auch wenn für diesen TLR bis dato keine direkte Bindung seines Agonisten CpG-DNA nachgewiesen werden konnte, deuten mehrere Daten von S. Bauer und Mitarbeitern in diese Richtung [Bauer, 2001b; Schetter 2003]. So ist es wahrscheinlich, dass CpG-Motive innerhalb der ODN-Sequenzen direkt mit TLR9 interagieren, während flankierende Basenabschnitte frei bleiben. Wie oben dargestellt sind jedoch diese Abschnitte entscheidend an der Ausbildung von inter- und intramolekularen Interaktionen der ODNs beteiligt und unter Umständen für die Ausbildung von höhermolekularen Komplexen verantwortlich. Möglicherweise bieten die partikulären Strukturen der CpG-A-Komplexe bzw. CpG-B-beladene Nanopartikel multiple Bindungspartner für TLR9 und führen somit zu einer starken Quervernetzung dieses TLRs, während CpG-B als einzelnes Molekül kein Clustering auslöst. Unterschiede in Dauer und Ausmaß der Quervernetzung könnten Grund sein für die qualitativ differierenden Aktivitäten der beiden CpG-Klassen auf den identischen Zelltyp.

#### 4.2.6.8. Kooperieren andere Rezeptoren mit TLR9?

Der Prozess der Kolokalisation von TLRs und zusätzlichen Erkennungsstrukturen ist zurzeit Gegenstand intensiver Forschung [Underhill 2003]. So haben Modell-Studien einzelner TLRs gezeigt, dass die Kombination redundant vorhandener PAMP-Erkennungsmechanismen die Richtung der folgenden Signaltransduktion entscheidend beeinflussen kann. Auch für TLR9 wird ein solches Phänomen postuliert. Eine temporäre Kollaboration von TLR9 und dem B-Zell-Rezeptor soll z.B. für die Potenzierung eines CpG-Stimulus auf primäre B-Zellen verantwortlich sein [Bernasconi, 2003]. So konnten Leadbetter und Mitarbeiter *in vivo* nachweisen, dass primäre B-Zellen nur durch DNA-Antigenkomplexe in einem TLR9-abhängigen Prozess stark zur Proliferation angeregt wurden [Leadbetter, 2002]. Möglicherweise wurde in diesem Experiment durch die Bindung von CpG-DNA an Antigen künstlich eine Kolokalisation des B-Zell-Rezeptors und TLR9 herbeigeführt. Die räumliche Assoziation dieser beiden Rezeptoren könnte für eine Potenzierung der über sie

eingehenden Signale verantwortlich sein, wie schon exemplarisch für CD19 und den B-Zell-Rezeptor beschrieben [Gauld, 2002]. Physiologisch könnte ein ähnlicher Prozess durch die vermutlich unterschiedliche Quartärstruktur der zwei ODN-Klassen ausgelöst werden. Bedingt durch seine partikuläre Struktur könnte CpG-A zusätzliche Erkennungsstrukturen rekrutieren und diese folglich mit TLR9 kolokalisieren. Ein möglicher Bindungspartner wäre hierbei wiederum der SR-A, für den eine direkt Bindung an Poly-G-Motive beschrieben ist. Eine Kolokalisation von SR-A und TLR9 könnte die folgende Signaltransduktionskaskade entscheidend modulieren und somit Unterschiede der beiden CpG-Klassen erklären.

## 4.3. Klinische Relevanz der Ergebnisse

### *4.3.1. Von Maus zu Mensch*

Die Effektivität von CpG-DNA als Adjuvans einer humoralen Immunantwort ist inzwischen durch Primatenversuche und erste klinische Studien gut belegt. Bisher existieren jedoch wenige Daten, die zeigen, dass CpG-ODNs beim Menschen eine zelluläre Immunantwort verbessern können. Auch wenn zahlreiche Publikationen für das murine System gezeigt haben, dass CpG-DNA ein potentes Adjuvans ist, eine spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort zu generieren [Davila, 2000; Vabulas, 2000; Miconnet, 2002], so ist eine Extrapolation dieser Ergebnisse von Maus zu Mensch nicht möglich. Neben der für das murine und humane System beschriebenen Speziesspezifität in der TLR9-abhängigen Erkennung von CpG-Motiven scheint sich das Expressionsmuster von TLR9 im murinen und humanen System wesentlich zu unterscheiden [Bauer, 2001b; Hochrein, 2002; Hornung, 2002]. Während, wie in dieser Arbeit gezeigt, im humanen System lediglich PDCs und B-Zellen eine nennenswerte TLR9-Expression aufweisen und somit direkt auf CpG-DNA reagieren, werden im murinen Immunsystem auch Zellen myeloiden Ursprungs direkt durch CpG-DNA aktiviert [Sparwasser, 1998; Hacker, 2000; Stacey, 2000; Boonstra, 2003]. Auch wenn das murine Pendant zur PDC ähnlich auf den TLR9-Agonisten CpG reagiert, so zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede in der Reaktionsweise muriner myeloider APCs auf CpG-Stimulation. Bei diesen Zellen führt Aktivierung via TLR9 zu einer lang-andauernden Produktion von IL-12 und sukzessive zu einer effektiven TH1-Immunantwort. Eine nennenswerte IL-12-Produktion wird im humanen System auf alleinige CpG-Stimulation nicht beobachtet. Die immense Bedeutung von CpG-induziertem IL-12 in der Maus belegen jedoch Experimente, in denen die

funktionelle Ausschaltung dieses Zytokins die Induktion einer spezifischen Immunantwort komplett verhinderte [Walker, 1999]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass zumindest im murinen System die Hauptwirkung des TLR9-Agonisten CpG-DNA in der Induktion einer spezifischen Immunantwort über Zellen der myeloiden Stammreihe vermittelt wird, die im humanen System jedoch nicht auf CpG reagieren.

Ein wichtiger Schritt für eine erfolgreiche Übertragung der CpG-Technologie von der Grundlagenforschung in die Klinik wird es somit sein, einerseits optimale „humane“ CpG-DNA-Sequenzen zu identifizieren, und andererseits deren Wirkprofil in geeigneten Tiermodellen zu charakterisieren. Das Hauptaugenmerk in der sinnvollen Erprobung des Impfadjuvans CpG-DNA im Tierversuch sollte nicht auf das Vakzinierungsergebnis alleine gelegt werden, sondern stets auch die primären Zielzellen und ihr jeweiliges „immunologisches Repertoire“ einschließen. Um Spezies-bedingte Unterschiede in der TLR9-Expression zu umgehen, wäre es ein interessanter Ansatz humane CpG-Motive in Mäusen mit humanisiertem Immunsystem (Hu-PBMC-SCID Mäuse) zu untersuchen.

### *4.3.2. Klinische Bedeutung der unterschiedlichen CpG-Klassen*

Den Ergebnissen dieser Arbeit nach ist die gezielte Auswahl einer bestimmten CpG-Klasse zum Erreichen eines gewünschten Impfeffekts von großer Bedeutung. Eigenen Daten zufolge ist CpG-B das überlegene Adjuvans in einer Vakzinierungsstratgie, die darauf abzielt, eine primäre Immunantwort zu induzieren. Dies ist insbesondere bei einer prophylaktischen Impfung erforderlich, wäre aber auch entscheidend, um in einer therapeutischen Vakzinierungsstratgie eine T-Zell-Ignoranz gegenüber Tumorantigenen zu durchbrechen. In bestimmten Phasen einer chronischen Infektion oder bei Tumorpatienten ist jedoch oft nicht die *de novo* Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen, sondern die Aktivität dieser T-Zellen der limitierende Faktor einer effektiven Immunantwort. In diesen Situationen könnten Vakzinierungen, die CpG-A als Adjuvans einsetzen, aussichtsreich sein, um präexistierende T-Zellen zu expandieren und eine eventuelle Anergie zu durchbrechen. Bei manchen Tumorerkrankungen spielt ferner eine NK-Zell-vermittelte Immunantwort eine wichtige Rolle. Eine zusätzliche NK-Zell-Aktivierung durch CpG-A könnte hier von Vorteil sein. So zeigen CpG-A-ODNs im murinen System insbesondere bei NK-Zell-sensitiven Tumoren eine äußerst effektive therapeutische Wirksamkeit, obwohl

sonst CpG-B-analoge ODNs in der Immuntherapie von murinen Tumoren überlegen sind [Ballas, 2001].

Da manche biologischen Eigenschaften von CpG-A und -B sich komplementär zueinander verhalten, wäre auch ein sequenzieller Einsatz dieser beiden Klassen in einer Vakzinierungstrategie sinnvoll. Effektives Priming naiver T-Zellen durch CpG-B und anschließende Expansion und Steigerung der lytischen Aktivität durch CpG-A.

Erste *in vivo*-Versuche in Primaten (Rhesusaffen) scheinen diese Ergebnisse teilweise zu unterstützen. Verthelyi und Mitarbeiter konnten bei einem Vergleich von CpG-Typ K (entspricht CpG-B) und CpG-Typ D (entspricht CpG-A) als Adjuvans einer Vakzine gegen Hitze-getöte Leishmanien beobachten, dass CpG-B mehr Antigen-spezifische T-Zellen induzierte als CpG-A. Letztere CpG-Klasse erwies sich jedoch als das effektivere Adjuvans, wenn ein Marker der zytotoxischen Aktivität gemessen wurde [Verthelyi, 2002].

# 5. ZUSAMMENFASSUNG

*Einleitung*

DNA wurde bislang vor allem als biologischer Speicher für die Vielzahl der Gene des Erbguts betrachtet. Seit kurzer Zeit wird die funktionelle Bedeutung von DNA weiter gefasst. Unterschiede im Aufbau von mikrobieller DNA (sogenannte CpG-Motive) im Vergleich zur Wirbeltier-DNA ermöglichen dem Immunsystem, potenzielle Krankheitserreger aufgrund ihrer DNA-Struktur zu erkennen. CpG-Motive sind nichtmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide mit bestimmten flankierenden Basensequenzen. Synthetische Oligonukleotide, die solche CpG-Motive enthalten, imitieren die Anwesenheit von mikrobieller DNA und induzieren ein charakteristisches Aktivierungsmuster des Immunsystems.

Infolge eines multimodalen Eingreifens von CpG-Oligonukleotiden kommt es zu einer koordinierten Immunantwort, wie sie zur erfolgreichen Abwehr von mikrobiellen Eindringlingen erforderlich ist. Damit besitzt CpG-DNA in einer potenziellen therapeutischen Anwendung als Adjuvans einer Vakzine deutliche Vorteile im Vergleich zu Einzelkomponenten, wie der Gabe von Zytokinen, da die „natürliche Botschaft“ der Gefahr einer mikrobiellen Infektion imitiert wird. Durch die immunstimulatorische Wirkung von CpG-DNA sind im Tiermodell therapeutische Aktivitäten bei Infektion, Tumoren und Allergie nachweisbar, die Hoffnungen auf eine erfolgreiche klinische Anwendung beim Menschen wecken. Obwohl auch erste klinische Studien die günstigen Eigenschaften von CpG-Oligonukleotiden als Vakzine-Adjuvans andeuten, zeigte die Forschung der letzten Jahre, dass deutliche Unterschiede in der Erkennung und Wirkung von CpG-Motiven zwischen murinem und humanem Immunsystem bestehen. Einerseits zeigte sich, dass in der Maus aktive CpG-Motive im humanen System nur eine schwache Wirkung entfalten, andererseits wurde deutlich, dass entscheidende Unterschiede in der Verteilung primärer CpG-reaktiver Zelltypen zwischen den beiden Immunsystemen bestehen.

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit wurde insbesondere für das humane System der genaue Wirkungsmechanismus CpG-Motiv-haltiger DNA auf Effektorzellen der angeborenen Immunität und auf die Induktion einer adaptiven Immunantwort äußerst kontrovers diskutiert. Erst seitdem bekannt ist, dass die Expression von *Toll-like*-Rezeptor-9 (TLR9) notwendig ist, um CpG-DNA zu erkennen, ist es möglich, gezielt

CpG-sensitive Zellpopulationen zu identifizieren und auf ihre biologische Antwort hin zu untersuchen.

*Fragestellung*

Ziel dieser Arbeit war es, durch genaue Analyse der *Toll-like*-Rezeptor-Expression in humanen Immunzellen, diejenigen Zellen zu identifizieren, die direkt durch CpG-Motiv-haltige DNA aktiviert werden und mit diesem Wissen die Wirkung immunstimulatorischer DNA auf Effektorzellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort im humanen System genauer zu charakterisieren. Im Hinblick auf den möglichen klinischen Einsatz immunstimulatorischer DNA als Adjuvans einer therapeutischen Vakzine wurde insbesondere Augenmerk auf die Möglichkeit der Induktion einer zellulären spezifischen Immunantwort gelegt. Hierzu sollte ein an die klinische Situation angepasstes *in vitro*-Modell etabliert werden, um verschiedene Klassen von CpG-Oligonukleotiden bezüglich ihrer kostimulatorischen Wirkung auf eine Antigen-spezifische T-Zellantwort hin zu untersuchen. Durch geeignete experimentelle Bedingungen sollten ferner mögliche Unterschiede in der Kostimulation einer primären Immunantwort und in der Reaktivierung einer Gedächtnis-T-Zellantwort durch CpG-ODNs skizziert werden.

*Ergebnisse*

Die genaue Analyse der TLR-Expression humaner Lymphozyten des peripheren Blutes zeigte, dass lediglich die plasmazytoide dendritische Zelle und die B-Zelle TLR9 exprimieren. Konsequenterweise ergaben funktionelle Untersuchungen, dass im humanen Immunsystem sie die einzigen Zellpopulationen darstellen, die direkt durch CpG-Motiv-haltige Oligonukleotide aktiviert werden können. Andere Zellpopulationen wie Monozyten, myeloide dendritische Zellen, NK-Zellen und T-Zellen werden lediglich indirekt durch PDC-abhängige Zytokine stimuliert.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurden insbesondere die Effekte der CpG-Stimulation auf T-Zellen und NK-Zellen im humanen Immunsystem untersucht. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Klassen von CpG-Oligonukleotiden, CpG-A und CpG-B, die sich in ihrer Struktur und ihrer Fähigkeit IFN-$\alpha$ in plasmazytoiden dendritischen Zellen zu induzieren unterscheiden. CpG-A bewirkt, einer Virusinfektion vergleichbar, eine massive Induktion von IFN Typ I in

PDCs. Über Induktion von IFN-$\alpha$ und -$\beta$ kommt es zu einer starken Aktivierung von NK-Zellen, einer Antigen-unabhängigen Teilaktivierung von Gedächtnis-CD8+ T-Zellen und ferner zu einer Förderung der Proliferation, IFN-$\gamma$-Produktion und lytischen Aktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen. In Analogie dazu lassen sich Antigen-erfahrene CD8+ T-Zellen durch CpG-A zu Proliferation und erhöhter Zytotoxizität stimulieren. Ein Priming von naiven CD8+ T-Zellen in dem Peptid-Antigen-Modell dieser Arbeit wird durch CpG-A jedoch nicht erreicht.

Auf der anderen Seite stellt CpG-B ein potentes Adjuvans in der Expansion sowohl naiver als auch Antigen-erfahrener CD8+ T-Zellen dar. Gemäß der geringen Induktion von IFN Typ I in PDCs kommt es durch CpG-B zu keiner Aktivierung von Effektorlymphozyten der angeborenen Immunität wie NK-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen oder Antigen-erfahrenen T-Zellklonen.

*Schlussfolgerung*

Die Effektivität von CpG-Oligonukleotiden als Adjuvans einer humoralen Immunantwort ist inzwischen durch Studien an Primaten und ersten klinischen Studien am Menschen gut belegt. Bisher existieren wenige Daten, die belegen, dass CpG-Oligonukleotide im humanen System eine zelluläre Immunantwort verbessern können. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass zumindest in einem *in vitro*-Modell CpG-DNA auch beim Menschen ein potentes Adjuvans für die Induktion einer zellulären Immunantwort darstellt und macht Hoffnung, dass CpG-ODNs auch zu diesem Zweck erfolgreich in klinischen Studien eingesetzt werden können.

# 6. LITERATURVERZEICHNIS


Agarwal, S. and Rao, A. (1998). "Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation." Immunity **9**(6): 765-75.

Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M. and Wagner, H. (2002). "Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments." Eur J Immunol **32**(7): 1958-68.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-8.

Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J. and Davis, M. M. (1996). "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes." Science **274**(5284): 94-6.

Anderson, K. V. (2000). "Toll signaling pathways in the innate immune response." Curr Opin Immunol **12**: 13-9.

Azuma, M., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. (1993). "CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties." J Immunol **150**(4): 1147-59.

Ballas, Z. K., Krieg, A. M., Warren, T., Rasmussen, W., Davis, H. L., Waldschmidt, M. and Weiner, G. J. (2001). "Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs." J Immunol **167**(9): 4878-86.

Ballas, Z. K., Rasmussen, W. L. and Krieg, A. M. (1996). "Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA." J Immunol **157**(5): 1840-5.

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

Barton, G. M. and Medzhitov, R. (2002a). "Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors." Curr Opin Immunol **14**(3): 380-3.

Barton, G. M. and Medzhitov, R. (2002b). "Toll-like receptors and their ligands." Curr Top Microbiol Immunol **270**: 81-92.

Bauer, M., Redecke, V., Ellwart, J. W., Scherer, B., Kremer, J. P., Wagner, H. and Lipford, G. B. (2001a). "Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells." J Immunol **166**(8): 5000-7.

Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. and Lipford, G. B. (2001b). "Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **24**: 24.

Belvin, M. P. and Anderson, K. V. (1996). "A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 393-416.

Bendigs, S., Salzer, U., Lipford, G. B., Wagner, H. and Heeg, K. (1999). "CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells." Eur J Immunol **29**(4): 1209-18.

Bernasconi, N. L., Onai, N. and Lanzavecchia, A. (2003). "A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells." Blood **101**(11): 4500-4.

Billiau, A. (1996). "Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis." Adv Immunol **62**: 61-130.

Biron, C. A. (2001). "Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look." Immunity **14**(6): 661-4.

Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. and Salazar-Mather, T. P. (1999). "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." Annu Rev Immunol **17**: 189-220.

Bjorck, P. (2001). "Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice." Blood **98**(13): 3520-6.

Bogdan, C. (2000). "The function of type I interferons in antimicrobial immunity." Curr Opin Immunol **12**(4): 419-24.

Bohle, B., Jahn-Schmid, B., Maurer, D., Kraft, D. and Ebner, C. (1999). "Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and IFN-gamma production in cells from allergic individuals and inhibit IgE synthesis in vitro." Eur J Immunol **29**(7): 2344-53.

Bohle, B., Orel, L., Kraft, D. and Ebner, C. (2001). "Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce low levels of TNF- alpha in human B lymphocytes: possible adjuvants for Th1 responses." J Immunol **166**(6): 3743-8.

Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y. J. and O'Garra, A. (2003). "Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation." J Exp Med **197**(1): 101-9.

Borthwick, N. J., Lowdell, M., Salmon, M. and Akbar, A. N. (2000). "Loss of CD28 expression on CD8(+) T cells is induced by IL-2 receptor gamma chain signalling cytokines and type I IFN, and increases susceptibility to activation-induced apoptosis." Int Immunol **12**(7): 1005-13.

Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N. and Mantovani, A. (2003). "The Toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells." Blood.

Brunner, C., Seiderer, J., Schlamp, A., Bidlingmaier, M., Eigler, A., Haimerl, W., Lehr, H. A., Krieg, A. M., Hartmann, G. and Endres, S. (2000). "Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate- guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti- tumor immune responses in vivo." J Immunol **165**(11): 6278-86.

Byrnes, A. A., Ma, X., Cuomo, P., Park, K., Wahl, L., Wolf, S. F., Zhou, H., Trinchieri, G. and Karp, C. L. (2001). "Type I interferons and IL-12: convergence and cross-regulation among mediators of cellular immunity." Eur J Immunol **31**(7): 2026-34.

Caramalho, I., Lopes-Carvalho, T., Ostler, D., Zelenay, S., Haury, M. and Demengeot, J. (2003). "Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide." J Exp Med **197**(4): 403-11.

Carding, S. R. and Egan, P. J. (2002). "Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity." Nat Rev Immunol **2**(5): 336-45.

Carpentier, A. F., Chen, L., Maltonti, F. and Delattre, J. Y. (1999). "Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice." Cancer Res **59**(21): 5429-32.

Carpentier, A. F., Xie, J., Mokhtari, K. and Delattre, J. Y. (2000). "Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs." Clin Cancer Res **6**(6): 2469-73.

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A. and Banchereau, J. (1997). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis." Blood **90**(4): 1458-70.

Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A. and Colonna, M. (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**(8): 919-23.

Chehimi, J., Starr, S. E., Kawashima, H., Miller, D. S., Trinchieri, G., Perussia, B. and Bandyopadhyay, S. (1989). "Dendritic cells and IFN-alpha-producing cells are two functionally distinct non-B, non-monocytic HLA-DR+ cell subsets in human peripheral blood." Immunology **68**(4): 488-90.

Chelvarajan, R. L., Raithatha, R., Venkataraman, C., Kaul, R., Han, S. S., Robertson, D. A. and Bondada, S. (1999). "CpG oligodeoxynucleotides overcome the unresponsiveness of neonatal B cells to stimulation with the thymus-independent stimuli anti-IgM and TNP-Ficoll." Eur J Immunol **29**(9): 2808-18.

Chien, Y. H., Iwashima, M., Kaplan, K. B., Elliott, J. F. and Davis, M. M. (1987). "A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation." Nature **327**(6124): 677-82.

Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V. and Harding, C. V. (1997). "CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity." J Exp Med **186**(10): 1623-31.

Chuang, T. and Ulevitch, R. J. (2001). "Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells." Biochim Biophys Acta **1518**(1-2): 157-61.

Cocks, B. G., Chang, C. C., Carballido, J. M., Yssel, H., de Vries, J. E. and Aversa, G. (1995). "A novel receptor involved in T-cell activation." Nature **376**(6537): 260-3.

Coley, W. B. (1991). "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893." Clin Orthop(262): 3-11.

Cousens, L. P., Peterson, R., Hsu, S., Dorner, A., Altman, J. D., Ahmed, R. and Biron, C. A. (1999). "Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection." J Exp Med **189**(8): 1315-28.

Cowdery, J. S., Chace, J. H., Yi, A. K. and Krieg, A. M. (1996). "Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides." J Immunol **156**(12): 4570-5.

Dalod, M., Salazar-Mather, T. P., Malmgaard, L., Lewis, C., Asselin-Paturel, C., Briere, F., Trinchieri, G. and Biron, C. A. (2002). "Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo." J Exp Med **195**(4): 517-28.

Davila, E. and Celis, E. (2000). "Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity." J Immunol **165**(1): 539-47.

Davis, H. L., Suparto, II, Weeratna, R. R., Jumintarto, Iskandriati, D. D., Chamzah, S. S., Ma'ruf, A. A., Nente, C. C., Pawitri, D. D., Krieg, A. M., Heriyanto, Smits, W. and Sajuthi, D. D. (2000). "CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans." Vaccine **18**(18): 1920-4.

Davis, H. L., Weeratna, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J., Krieg, A. M. and Weeranta, R. (1998). "CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen." J Immunol **160**(2): 870-6.

Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C. and Bhardwaj, N. (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." J Exp Med **193**(2): 233-8.

Dow, S. W., Fradkin, L. G., Liggitt, D. H., Willson, A. P., Heath, T. D. and Potter, T. A. (1999). "Lipid-DNA complexes induce potent activation of innate immune responses and antitumor activity when administered intravenously." J Immunol **163**(3): 1552-61.

Doyle, S., Vaidya, S., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P., Wu, T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M., Modlin, R. and Cheng, G. (2002). "IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program." Immunity **17**(3): 251-63.

Du, X., Poltorak, A., Wei, Y. and Beutler, B. (2000). "Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution." Eur Cytokine Netw **11**(3): 362-71.

Dzionek, A., Inagaki, Y., Okawa, K., Nagafune, J., Rock, J. J., Sohma, Y., Winkels, G., Zysk, M., Yamaguchi, Y. and Schmitz, J. J. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions(1)." Hum Immunol **63**(12): 1133-48.

Eckstein, F. (1985). "Nucleoside phosphorothioates." Annu Rev Biochem **54**: 367-402.

Elkins, K. L., Rhinehart-Jones, T. R., Stibitz, S., Conover, J. S. and Klinman, D. M. (1999). "Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria." J Immunol **162**(4): 2291-8.

Erickson, S., Sangfelt, O., Castro, J., Heyman, M., Einhorn, S. and Grander, D. (1999). "Interferon-alpha inhibits proliferation in human T lymphocytes by abrogation of interleukin 2-induced changes in cell cycle-regulatory proteins." Cell Growth Differ **10**(8): 575-82.

Facchetti, F., De Wolf-Peeters, C., De Vos, R., van den Oord, J. J., Pulford, K. A. and Desmet, V. J. (1989a). "Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T cells) in granulomatous lymphadenitis." Hum Pathol **20**(6): 588-93.

Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., Mason, D. Y., Pulford, K., van den Oord, J. J. and Desmet, V. J. (1988). "Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin." Am J Pathol **133**(1): 15-21.

Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., van den Oord, J. J., de Vos, R. and Desmet, V. J. (1989b). "Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T-cells) in Kikuchi's lymphadenitis. An immunohistologic study." Am J Clin Pathol **92**(1): 42-50.

Facchetti, F., De Wolf-Peeters, C., van den Oord, J. J. and Desmet, V. J. (1989c). "Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T cells) in Hodgkin's disease." J Pathol **158**(1): 57-65.

Farrar, M. A. and Schreiber, R. D. (1993). "The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor." Annu Rev Immunol **11**: 571-611.

Feldman, M. and Fitzgerald-Bocarsly, P. (1990). "Sequential enrichment and immunocytochemical visualization of human interferon-alpha-producing cells." J Interferon Res **10**(4): 435-46.

Feller, A. C., Lennert, K., Stein, H., Bruhn, H. D. and Wuthe, H. H. (1983). "Immunohistology and aetiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Report of three instructive cases." Histopathology **7**(6): 825-39.

Ferrick, D. A., Schrenzel, M. D., Mulvania, T., Hsieh, B., Ferlin, W. G. and Lepper, H. (1995). "Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo." Nature **373**(6511): 255-7.

Fisch, P., Meuer, E., Pende, D., Rothenfusser, S., Viale, O., Kock, S., Ferrone, S., Fradelizi, D., Klein, G., Moretta, L., Rammensee, H. G., Boon, T., Coulie, P. and van der Bruggen, P. (1997). "Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity." Eur J Immunol **27**(12): 3368-79.

Fitzgerald-Bocarsly, P. (1993). "Human natural interferon-alpha producing cells." Pharmacol Ther **60**(1): 39-62.

Fong, L. and Engleman, E. G. (2000). "Dendritic cells in cancer immunotherapy." Annu Rev Immunol **18**: 245-73.

Gallucci, S., Lolkema, M. and Matzinger, P. (1999). "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." Nat Med **5**(11): 1249-55.

Garcia, V. E., Jullien, D., Song, M., Uyemura, K., Shuai, K., Morita, C. T. and Modlin, R. L. (1998). "IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to nonpeptide [correction of nonpetide] microbial antigens." J Immunol **160**(9): 4322-9.

Garcia, V. E., Sieling, P. A., Gong, J., Barnes, P. F., Uyemura, K., Tanaka, Y., Bloom, B. R., Morita, C. T. and Modlin, R. L. (1997). "Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens." J Immunol **159**(3): 1328-35.

Gauld, S. B., Dal Porto, J. M. and Cambier, J. C. (2002). "B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease." Science **296**(5573): 1641-2.

Ghanekar, S., Zheng, L., Logar, A., Navratil, J., Borowski, L., Gupta, P. and Rinaldo, C. (1996). "Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and herpes simplex virus." J Immunol **157**(9): 4028-36.

Gilliet, M. and Liu, Y. J. (2002a). "Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **195**(6): 695-704.

Gilliet, M. and Liu, Y. J. (2002b). "Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells." Hum Immunol **63**(12): 1149-55.

Gotch, F., Rothbard, J., Howland, K., Townsend, A. and McMichael, A. (1987). "Cytotoxic T lymphocytes recognize a fragment of influenza virus matrix protein in association with HLA-A2." Nature **326**(6116): 881-2.

Groh, V., Steinle, A., Bauer, S. and Spies, T. (1998). "Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells." Science **279**(5357): 1737-40.

Grouard, G., Rissoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J. and Liu, Y. J. (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." J Exp Med **185**(6): 1101-11.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. and Amigorena, S. (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." Annu Rev Immunol **20**: 621-67.

Gursel, M., Verthelyi, D., Gursel, I., Ishii, K. J. and Klinman, D. M. (2002a). "Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide." J Leukoc Biol **71**(5): 813-20.

Gursel, M., Verthelyi, D. and Klinman, D. M. (2002b). "CpG oligodeoxynucleotides induce human monocytes to mature into functional dendritic cells." Eur J Immunol **32**(9): 2617-22.

Guthridge, M. A., Stomski, F. C., Thomas, D., Woodcock, J. M., Bagley, C. J., Berndt, M. C. and Lopez, A. F. (1998). "Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors." Stem Cells **16**(5): 301-13.

Hacker, H. (2000). "Signal transduction pathways activated by CpG-DNA." Curr Top Microbiol Immunol **247**: 77-92.

Hacker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Lipford, G. B. and Wagner, H. (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**(21): 6230-40.

Hacker, H., Vabulas, R. M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S. and Wagner, H. (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**(4): 595-600.

Han, J., Zhu, Z., Hsu, C. and Finley, W. H. (1994). "Selection of antisense oligonucleotides on the basis of genomic frequency of the target sequence." Antisense Res Dev **4**(1): 53-65.

Hartmann, G., Battiany, J., Poeck, H., Wagner, M., Kerkmann, M., Lubenow, N., Rothenfusser, S. and Endres, S. (2003). "Rational design of new CpG

oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **33**(6): 1633-41.

Hartmann, G. and Krieg, A. M. (1999a). "CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes." Gene Ther **6**(5): 893-903.

Hartmann, G. and Krieg, A. M. (2000a). "Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells." J Immunol **164**(2): 944-53.

Hartmann, G., Weeratna, R. D., Ballas, Z. K., Payette, P., Blackwell, S., Suparto, I., Rasmussen, W. L., Waldschmidt, M., Sajuthi, D., Purcell, R. H., Davis, H. L. and Krieg, A. M. (2000b). "Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo." J Immunol **164**(3): 1617-24.

Hartmann, G., Weiner, G. J. and Krieg, A. M. (1999b). "CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9305-10.

Hashimoto, C., Hudson, K. L. and Anderson, K. V. (1988). "The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." Cell **52**(2): 269-79.

Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. and Aderem, A. (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." Nature **410**(6832): 1099-103.

Hayday, A. C. (2000). "γδ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection." Annu Rev Immunol **18**: 975-1026.

Heckelsmiller, K., Beck, S., Rall, K., Sipos, B., Schlamp, A., Tuma, E., Rothenfusser, S., Endres, S. and Hartmann, G. (2002a). "Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy." Eur J Immunol **32**(11): 3235-45.

Heckelsmiller, K., Rall, K., Beck, S., Schlamp, A., Seiderer, J., Jahrsdorfer, B., Krug, A., Rothenfusser, S., Endres, S. and Hartmann, G. (2002b). "Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model." J Immunol **169**(7): 3892-9.

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K. and Akira, S. (2003). "The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets." J Immunol **170**(6): 3059-64.

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. and Akira, S. (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." Nat Immunol **3**(2): 196-200.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**(6813): 740-5.

Hochrein, H., O'Keeffe, M. and Wagner, H. (2002). "Human and mouse plasmacytoid dendritic cells." Hum Immunol **63**(12): 1103-10.

Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A. and Medzhitov, R. (2002). "The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors." Nature **420**(6913): 329-33.

Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G. (2002). "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides." J Immunol **168**(9): 4531-7.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira, S. (1999). "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice

are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product." J Immunol **162**(7): 3749-52.

Iho, S., Yamamoto, T., Takahashi, T. and Yamamoto, S. (1999). "Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cells to induce IFN-gamma production in vitro." J Immunol **163**(7): 3642-52.

Ikuta, K., Kina, T., MacNeil, I., Uchida, N., Peault, B., Chien, Y. H. and Weissman, I. L. (1990). "A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells." Cell **62**(5): 863-74.

Imler, J. L. and Hoffmann, J. A. (2003). "Toll signaling: the TIReless quest for specificity." Nat Immunol **4**(2): 105-6.

Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957). "Virus interference. I. The interferon." Proc R Soc Lond **147**: 258.

Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1987). "Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957." J Interferon Res **7**(5): 429-38.

Ismaili, J., Olislagers, V., Poupot, R., Fournie, J. J. and Goldman, M. (2002). "Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation." Clin Immunol **103**(3 Pt 1): 296-302.

Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., Ozaki, Y., Tomizawa, H., Akira, S. and Fukuhara, S. (2002). "Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets." J Exp Med **195**(11): 1507-12.

Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., Saeland, S., Fukuhara, S. and Ikehara, S. (1999). "A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells." J Immunol **163**(3): 1409-19.

Jager, E., Hohn, H., Necker, A., Forster, R., Karbach, J., Freitag, K., Neukirch, C., Castelli, C., Salter, R. D., Knuth, A. and Maeurer, M. J. (2002). "Peptide-specific CD8+ T-cell evolution in vivo: response to peptide vaccination with Melan-A/MART-1." Int J Cancer **98**(3): 376-88.

Jahrsdorfer, B., Hartmann, G., Racila, E., Jackson, W., Muhlenhoff, L., Meinhardt, G., Endres, S., Link, B. K., Krieg, A. M. and Weiner, G. J. (2001). "CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens." J Leukoc Biol **69**(1): 81-8.

Janeway, C. A., Jr. (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." Immunol Today **13**(1): 11-6.

Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2001). "Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **31**(11): 3388-93.

Jitsukawa, S., Faure, F., Lipinski, M., Triebel, F. and Hercend, T. (1987). "A novel subset of human lymphocytes with a T cell receptor-gamma complex." J Exp Med **166**(4): 1192-7.

Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G. and Bauer, S. (2002). "Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848." Nat Immunol **3**(6): 499.

Kadowaki, N., Antonenko, S. and Liu, Y. J. (2001a). "Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN." J Immunol **166**(4): 2291-5.

Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F. and Liu, Y. J. (2001b). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens." J Exp Med **194**(6): 863-9.

Kadowaki, N. and Liu, Y. J. (2002). "Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity." Hum Immunol **63**(12): 1126-32.

Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K. and Akira, S. (2001). "Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells." J Immunol **166**(9): 5688-94.

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999). "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." Immunity **11**(1): 115-22.

Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P. F., Sato, S., Hoshino, K. and Akira, S. (2001). "Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes." J Immunol **167**(10): 5887-94.

Kerkmann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G. (2003). "Activation with CpG-A and CpG-B Oligonucleotides Reveals Two Distinct Regulatory Pathways of Type I IFN Synthesis in Human Plasmacytoid Dendritic Cells." J Immunol **170**(9): 4465-74.

Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H. L., Weissman, I. L. and Yokoyama, W. M. (2000). "In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2731-6.

Kim, S. K., Ragupathi, G., Musselli, C., Choi, S. J., Park, Y. S. and Livingston, P. O. (1999). "Comparison of the effect of different immunological adjuvants on the antibody and T-cell response to immunization with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugate cancer vaccines." Vaccine **18**(7-8): 597-603.

Klinman, D. M., Takeshita, F., Gursel, I., Leifer, C., Ishii, K. J., Verthelyi, D. and Gursel, M. (2002). "CpG DNA: recognition by and activation of monocytes." Microbes Infect **4**(9): 897-901.

Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J. and Krieg, A. M. (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**(7): 2879-83.

Kranzer, K., Bauer, M., Lipford, G. B., Heeg, K., Wagner, H. and Lang, R. (2000). "CpG-oligodeoxynucleotides enhance T-cell receptor-triggered interferon-gamma production and up-regulation of CD69 via induction of antigen-presenting cell-derived interferon type I and interleukin-12." Immunology **99**(2): 170-8.

Krieg, A. M. (2002). "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." Annu Rev Immunol **20**: 709-60.

Krieg, A. M., Love-Homan, L., Yi, A. K. and Harty, J. T. (1998a). "CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to Listeria monocytogenes challenge." J Immunol **161**(5): 2428-34.

Krieg, A. M., Wu, T., Weeratna, R., Efler, S. M., Love-Homan, L., Yang, L., Yi, A. K., Short, D. and Davis, H. L. (1998b). "Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12631-6.

Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. and Klinman, D. M. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." Nature **374**: 546-9.

Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z. K., Endres, S., Krieg, A. M. and Hartmann, G. (2001a). "Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **31**(7): 2154-63.

Krug, A., Rothenfusser, S., Selinger, S., Bock, C., Kerkmann, M., Battiany, J., Sarris, A., Giese, T., Speiser, D., Endres, S. and Hartmann, G. (2003). "CpG-A

oligonucleotides induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells." J Immunol **170**(7): 3468-77.

Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A. M. and Hartmann, G. (2001b). "Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12." Eur J Immunol **31**(10): 3026-37.

Kuramoto, E., Yano, O., Kimura, Y., Baba, M., Makino, T., Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T. and Tokunaga, T. (1992). "Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation." Jpn J Cancer Res **83**(11): 1128-31.

Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J. and Finberg, R. W. (2000). "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus." Nat Immunol **1**(5): 398-401.

Ladel, C. H., Blum, C. and Kaufmann, S. H. (1996). "Control of natural killer cell-mediated innate resistance against the intracellular pathogen Listeria monocytogenes by gamma/delta T lymphocytes." Infect Immun **64**(5): 1744-9.

Lanier, L. L. (1998). "NK cell receptors." Annu Rev Immunol **16**: 359-93.

Latz, E., Visintin, A., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Kurt-Jones, E. A., Golenbock, D. T. and Espevik, T. (2002). "Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction." J Biol Chem **277**(49): 47834-43.

Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F. and Tough, D. F. (2001). "Type i interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo." Immunity **14**(4): 461-70.

Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M. J. and Marshak-Rothstein, A. (2002). "Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors." Nature **416**(6881): 603-7.

Lee, P. P., Yee, C., Savage, P. A., Fong, L., Brockstedt, D., Weber, J. S., Johnson, D., Swetter, S., Thompson, J., Greenberg, P. D., Roederer, M. and Davis, M. M. (1999). "Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients." Nat Med **5**(6): 677-85.

Lee, S. W., Song, M. K., Baek, K. H., Park, Y., Kim, J. K., Lee, C. H., Cheong, H. K., Cheong, C. and Sung, Y. C. (2000). "Effects of a hexameric deoxyriboguanosine run conjugation into CpG oligodeoxynucleotides on their immunostimulatory potentials." J Immunol **165**(7): 3631-9.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults." Cell **86**(6): 973-83.

Lennert, K. and Remmele, W. (1958). "Karyometrische Untersuchungen an Lymphknotenzellen des Menschen." Acta Haematologica **19**: 99-113.

Leslie, D. S., Vincent, M. S., Spada, F. M., Das, H., Sugita, M., Morita, C. T. and Brenner, M. B. (2002). "CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells." J Exp Med **196**(12): 1575-84.

Lipford, G. B., Bauer, M., Blank, C., Reiter, R., Wagner, H. and Heeg, K. (1997). "CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants." Eur J Immunol **27**(9): 2340-4.

Lipford, G. B., Bendigs, S., Heeg, K. and Wagner, H. (2000a). "Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines." Immunology **101**(1): 46-52.

Lipford, G. B., Sparwasser, T., Zimmermann, S., Heeg, K. and Wagner, H. (2000b). "CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses." J Immunol **165**(3): 1228-35.

Ljunggren, H. G. and Karre, K. (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol Today **11**(7): 237-44.

Long, E. O. (1999). "Regulation of immune responses through inhibitory receptors." Annu Rev Immunol **17**: 875-904.

Lopez-Botet, M., Perez-Villar, J. J., Carretero, M., Rodriguez, A., Melero, I., Bellon, T., Llano, M. and Navarro, F. (1997). "Structure and function of the CD94 C-type lectin receptor complex involved in recognition of HLA class I molecules." Immunol Rev **155**: 165-74.

Lozzio, C. B. and Lozzio, B. B. (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." Blood **45**(3): 321-34.

Macfarlane, D. E. and Manzel, L. (1998). "Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds." J Immunol **160**(3): 1122-31.

Manzel, L. and Macfarlane, D. E. (1998). "CpG-oligodeoxynucleotide supports growth of IL-6-dependent 7TD1 murine hybridoma cells." Life Sci **62**(1): 23-7.

Marrack, P., Kappler, J. and Mitchell, T. (1999). "Type I interferons keep activated T cells alive." J Exp Med **189**(3): 521-30.

McRae, B. L., Beilfuss, B. A. and van Seventer, G. A. (2000). "IFN-beta differentially regulates CD40-induced cytokine secretion by human dendritic cells." J Immunol **164**(1): 23-8.

Medzhitov, R. and Janeway, C. A., Jr. (1997a). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." Curr Opin Immunol **9**(1): 4-9.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A., Jr. (1997b). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.

Mellman, I. and Steinman, R. M. (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." Cell **106**(3): 255-8.

Messina, J. P., Gilkeson, G. S. and Pisetsky, D. S. (1991). "Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA." J Immunol **147**(6): 1759-64.

Messina, J. P., Gilkeson, G. S. and Pisetsky, D. S. (1993). "The influence of DNA structure on the in vitro stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucleotide antigens." Cell Immunol **147**(1): 148-57.

Miconnet, I., Koenig, S., Speiser, D., Krieg, A., Guillaume, P., Cerottini, J. C. and Romero, P. (2002). "CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide." J Immunol **168**(3): 1212-8.

Mingari, M. C., Poggi, A., Biassoni, R., Bellomo, R., Ciccone, E., Pella, N., Morelli, L., Verdiani, S., Moretta, A. and Moretta, L. (1991). "In vitro proliferation and cloning of CD3- CD16+ cells from human thymocyte precursors." J Exp Med **174**(1): 21-6.

Moldoveanu, Z., Love-Homan, L., Huang, W. Q. and Krieg, A. M. (1998). "CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus." Vaccine **16**(11-12): 1216-24.

Mombaerts, P., Arnoldi, J., Russ, F., Tonegawa, S. and Kaufmann, S. H. (1993). "Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen." Nature **365**(6441): 53-6.

Morales, A., Eidinger, D. and Bruce, A. W. (1976). "Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors." J Urol **116**(2): 180-3.

Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M. C. and Moretta, L. (1996). "Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells." Annu Rev Immunol **14**: 619-48.

Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M. and Aguet, M. (1994). "Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense." Science **264**(5167): 1918-21.

Murphy, K. M. and Reiner, S. L. (2002). "The lineage decisions of helper T cells." Nat Rev Immunol **2**(12): 933-44.

Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P. and Mantovani, A. (2000). "Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells." J Immunol **164**(11): 5998-6004.

Nakata, M., Smyth, M. J., Norihisa, Y., Kawasaki, A., Shinkai, Y., Okumura, K. and Yagita, H. (1990). "Constitutive expression of pore-forming protein in peripheral blood gamma/delta T cells: implication for their cytotoxic role in vivo." J Exp Med **172**(6): 1877-80.

Nauts, H. C. and McLaren, J. R. (1990). "Coley toxins--the first century." Adv Exp Med Biol **267**: 483-500.

Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K. and Akira, S. (2000). "Cutting Edge: Endotoxin Tolerance in Mouse Peritoneal Macrophages Correlates with Down-Regulation of Surface Toll-Like Receptor 4 Expression." J Immunol **164**(7): 3476-3479.

Nomura, N., Miyajima, N., Sazuka, T., Tanaka, A., Kawarabayasi, Y., Sato, S., Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K. and Tabata, S. (1994). "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1." DNA Res **1**(1): 27-35.

O'Doherty, U., Peng, M., Gezelter, S., Swiggard, W. J., Betjes, M., Bhardwaj, N. and Steinman, R. M. (1994). "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature." Immunology **82**(3): 487-93.

Ogata, H., Su, I., Miyake, K., Nagai, Y., Akashi, S., Mecklenbrauker, I., Rajewsky, K., Kimoto, M. and Tarakhovsky, A. (2000). "The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells." J Exp Med **192**(1): 23-9.

Ogg, G. S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P. R., Nowak, M. A., Monard, S., Segal, J. P., Cao, Y., Rowland-Jones, S. L., Cerundolo, V., Hurley, A., Markowitz, M., Ho, D. D., Nixon, D. F. and McMichael, A. J. (1998). "Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA." Science **279**(5359): 2103-6.

Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S. and Kolb, H. (2000). "Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex." J Immunol **164**(2): 558-61.

Ohsugi, Y., Gershwin, M. E., Owens, R. B. and Nelson-Rees, W. A. (1980). "Tumorigenicity of human malignant lymphoblasts: comparative study with unmanipulated nude mice, antilymphocyte serum-treated nude mice, and X-irradiated nude mice." J Natl Cancer Inst **65**(4): 715-8.

Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., Young, D. W., Ishizaka, S. T., Rose, J., Chow, J. C. and Strauss, J. F., 3rd (2001). "The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4." J Biol Chem **276**(13): 10229-33.

Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P. A., Carballido, J., Picker, L. J. and Lund-Johansen, F. (1997). "Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12551-6.

Ortaldo, J. R., Mantovani, A., Hobbs, D., Rubinstein, M., Pestka, S. and Herberman, R. B. (1983). "Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes." Int J Cancer **31**(3): 285-9.

Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. and Seya, T. (2003). "TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction." Nat Immunol **4**(2): 161-167.

Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L. and Aderem, A. (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13766-71.

Peiser, L., Mukhopadhyay, S. and Gordon, S. (2002). "Scavenger receptors in innate immunity." Curr Opin Immunol **14**(1): 123-8.

Perussia, B., Fanning, V. and Trinchieri, G. (1985). "A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses." Nat Immun Cell Growth Regul **4**(3): 120-37.

Pestka, S. (2000). "The human interferon alpha species and receptors." Biopolymers **55**(4): 254-87.

Pittet, M. J., Speiser, D. E., Valmori, D., Cerottini, J. C. and Romero, P. (2000). "Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+ T cells closely correlates with CD56 surface expression." J Immunol **164**(3): 1148-52.

Pittet, M. J., Valmori, D., Dunbar, P. R., Speiser, D. E., Lienard, D., Lejeune, F., Fleischhauer, K., Cerundolo, V., Cerottini, J. C. and Romero, P. (1999). "High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals." J Exp Med **190**(5): 705-15.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Huffel, C. V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-8.

Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P. and Malo, D. (1999). "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)." J Exp Med **189**(4): 615-25.

Redford, T. W., Yi, A. K., Ward, C. T. and Krieg, A. M. (1998). "Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides." J Immunol **161**(8): 3930-5.

Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. and Bazan, J. F. (1998). "A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 588-93.

Rodewald, H. R., Moingeon, P., Lucich, J. L., Dosiou, C., Lopez, P. and Reinherz, E. L. (1992). "A population of early fetal thymocytes expressing Fc gamma RII/III contains precursors of T lymphocytes and natural killer cells." Cell **69**(1): 139-50.

Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M. and Schuler, G. (1994). "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." J Exp Med **180**(1): 83-93.

Saito, H., Kranz, D. M., Takagaki, Y., Hayday, A. C., Eisen, H. N. and Tonegawa, S. (1984). "Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences." Nature **309**: 757-762.

Salter, R. D., Howell, D. N. and Cresswell, P. (1985). "Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids." Immunogenetics **21**(3): 235-46.

Schetter, C. (2003). Recent progress in the understanding and clinical develpoment of immunostimulatory oligonucleotides. Workshop of the Paul Martini Foundation: "Therapeutic oligonucleotides in drug development", Berlin-Brandenburg Academy of Sciences; Berlin.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J. and Schreiber, R. D. (2001). "IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-11.

Shortman, K. and Heath, W. R. (2001). "Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells." Nat Immunol **2**(11): 988-9.

Shortman, K. and Liu, Y. J. (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.

Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. and Liu, Y. J. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-7.

Sparwasser, T., Koch, E. S., Vabulas, R. M., Heeg, K., Lipford, G. B., Ellwart, J. W. and Wagner, H. (1998). "Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells." Eur J Immunol **28**(6): 2045-54.

Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Hacker, H., Heeg, K. and Wagner, H. (1997). "Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock." Eur J Immunol **27**(7): 1671-9.

Spits, H., Couwenberg, F., Bakker, A. Q., Weijer, K. and Uittenbogaart, C. H. (2000). "Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2." J Exp Med **192**(12): 1775-84.

Squier, M. K. and Cohen, J. J. (1994). "Cell-mediated cytotoxic mechanisms." Curr Opin Immunol **6**(3): 447-52.

Stacey, K. J., Sester, D. P., Sweet, M. J. and Hume, D. A. (2000). "Macrophage activation by immunostimulatory DNA." Curr Top Microbiol Immunol **247**: 41-58.

Starr, S. E., Bandyopadhyay, S., Shanmugam, V., Hassan, N., Douglas, S., Jackson, S. J., Trinchieri, G. and Chehimi, J. (1993). "Morphological and functional differences between HLA-DR+ peripheral blood dendritic cells and HLA-DR+ IFN-alpha producing cells." Adv Exp Med Biol **329**: 173-8.

Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.

Sugaya, M., Nakamura, K. and Tamaki, K. (1999). "Interleukins 18 and 12 synergistically upregulate interferon-gamma production by murine dendritic epidermal T cells." J Invest Dermatol **113**(3): 350-4.

Sun, S., Beard, C., Jaenisch, R., Jones, P. and Sprent, J. (1997). "Mitogenicity of DNA from different organisms for murine B cells." J Immunol **159**(7): 3119-25.

Sun, S., Cai, Z., Langlade-Demoyen, P., Kosaka, H., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A. and Sprent, J. (1996). "Dual function of Drosophila cells as APCs for naive CD8+ T cells: implications for tumor immunotherapy." Immunity **4**(6): 555-64.

Sun, S., Zhang, X., Tough, D. and Sprent, J. (2000). "Multiple effects of immunostimulatory DNA on T cells and the role of type I interferons." Springer Semin Immunopathol **22**(1-2): 77-84.

Sun, S., Zhang, X., Tough, D. F. and Sprent, J. (1998). "Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA." J Exp Med **188**(12): 2335-42.

Svensson, H., Johannisson, A., Nikkila, T., Alm, G. V. and Cederblad, B. (1996). "The cell surface phenotype of human natural interferon-alpha producing cells as determined by flow cytometry." Scand J Immunol **44**(2): 164-72.

Taguchi, T., Mitcham, J. L., Dower, S. K., Sims, J. E. and Testa, J. R. (1996). "Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14." Genomics **32**(3): 486-8.

Takeshita, F., Leifer, C. A., Gursel, I., Ishii, K. J., Takeshita, S., Gursel, M. and Klinman, D. M. (2001). "Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells." J Immunol **167**(7): 3555-8.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999a). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." Immunity **11**(4): 443-51.

Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P. F. and Akira, S. (2000). "Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway." J Immunol **164**(2): 554-7.

Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Takeda, K. and Akira, S. (1999b). "TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family." Gene **231**(1-2): 59-65.

Tamm, I., Dorken, B. and Hartmann, G. (2001). "Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea?" Lancet **358**(9280): 489-97.

Tanaka, Y., Morita, C. T., Nieves, E., Brenner, M. B. and Bloom, B. R. (1995). "Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells." Nature **375**(6527): 155-8.

Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C. and Simon, J. C. (2002). "Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4." J Exp Med **195**(1): 99-111.

Testi, R., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. (1989). "Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca++] and stimulation of protein kinase C." J Immunol **142**(6): 1854-60.

Thoma-Uszynski, S., Kiertscher, S. M., Ochoa, M. T., Bouis, D. A., Norgard, M. V., Miyake, K., Godowski, P. J., Roth, M. D. and Modlin, R. L. (2000). "Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10." J Immunol **165**(7): 3804-10.

Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T. and Sudo, T. (1984). "Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity." J Natl Cancer Inst **72**: 955-62.

Tokunaga, T., Yamamoto, S. and Namba, K. (1988). "A synthetic single-stranded DNA, poly(dG,dC), induces interferon-alpha/beta and -gamma, augments natural killer activity, and suppresses tumor growth." Jpn J Cancer Res **79**(6): 682-6.

Tokunaga, T., Yamamoto, T. and Yamamoto, S. (1999). "How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA." Jpn J Infect Dis **52**(1): 1-11.

Toshchakov, V., Jones, B. W., Perera, P. Y., Thomas, K., Cody, M. J., Zhang, S., Williams, B. R., Major, J., Hamilton, T. A., Fenton, M. J. and Vogel, S. N. (2002). "TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages." Nat Immunol **3**(4): 392-8.

Tough, D. F., Borrow, P. and Sprent, J. (1996). "Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo." Science **272**(5270): 1947-50.

Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." Adv Immunol **47**: 187-376.

Trinchieri, G. (1995). "Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis." Semin Immunol **7**(2): 83-8.

Underhill, D. M. (2003). "Mini-review Toll-like receptors: networking for success." Eur J Immunol **33**(7): 1767-75.

Underhill, D. M., Ozinsky, A., Smith, K. D. and Aderem, A. (1999). "Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14459-63.

Vabulas, R. M., Pircher, H., Lipford, G. B., Hacker, H. and Wagner, H. (2000). "CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses." J Immunol **164**(5): 2372-8.

Valmori, D., Fonteneau, J. F., Lizana, C. M., Gervois, N., Lienard, D., Rimoldi, D., Jongeneel, V., Jotereau, F., Cerottini, J. C. and Romero, P. (1998). "Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues." J Immunol **160**(4): 1750-8.

Verthelyi, D., Ishii, K., Gursel, M., Takeshita, F. and Klinman, D. (2001). "Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs." J Immunol **166**(4): 2372-7.

Verthelyi, D., Kenney, R. T., Seder, R. A., Gam, A. A., Friedag, B. and Klinman, D. M. (2002). "CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates." J Immunol **168**(4): 1659-63.

Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J. H., Wyllie, D. H., Dower, S. K. and Segal, D. M. (2001). "Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells." J Immunol **166**(1): 249-55.

Walker, P. S., Scharton-Kersten, T., Krieg, A. M., Love-Homan, L., Rowton, E. D., Udey, M. C. and Vogel, J. C. (1999). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-gamma-dependent mechanisms." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6970-5.

Wallace, M., Malkovsky, M. and Carding, S. R. (1995). "Gamma/delta T lymphocytes in viral infections." J Leukoc Biol **58**(3): 277-83.

Werlen, G. and Palmer, E. (2002). "The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity." Curr Opin Immunol **14**(3): 299-305.

Wickstrom, E. (1997). "Antisense c-myc inhibition of lymphoma growth." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **7**(3): 225-8.

Wiemann, B. and Starnes, C. O. (1994). "Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective." Pharmacol Ther **64**(3): 529-64.

Williams, M. J., Rodriguez, A., Kimbrell, D. A. and Eldon, E. D. (1997). "The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in Drosophila host defense." Embo J **16**(20): 6120-30.

Wooldridge, J. E., Ballas, Z., Krieg, A. M. and Weiner, G. J. (1997). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma." Blood **89**(8): 2994-8.

Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Watase, T., Busch, D. H., Pamer, E. G., Kuwano, H. and Yoshikai, Y. (2002). "Overexpression of IL-15 in vivo increases antigen-driven memory CD8+ T cells following a microbe exposure." J Immunol **168**(3): 1198-203.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. and Akira, S. (2002a). "Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4." Nature **420**(6913): 324-9.

Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. and Akira, S. (2002b). "Cutting Edge: A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That Preferentially Activates the IFN-beta Promoter in the Toll-Like Receptor Signaling." J Immunol **169**(12): 6668-72.

Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O. and Tokunaga, T. (1992a). "Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are

required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity." J Immunol **148**(12): 4072-6.

Yamamoto, S., Yamamoto, T., Shimada, S., Kuramoto, E., Yano, O., Kataoka, T. and Tokunaga, T. (1992b). "DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth." Microbiol Immunol **36**: 983-97.

Yamamoto, T., Yamamoto, S., Kataoka, T., Komuro, K., Kohase, M. and Tokunaga, T. (1994). "Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro." Jpn J Cancer Res **85**: 775-9.

Yi, A. K., Chang, M., Peckham, D. W., Krieg, A. M. and Ashman, R. F. (1998a). "CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry." J Immunol **160**(12): 5898-906.

Yi, A. K., Hornbeck, P., Lafrenz, D. E. and Krieg, A. M. (1996a). "CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM-induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of c-myc and bcl-xL." J Immunol **157**(11): 4918-25.

Yi, A. K., Klinman, D. M., Martin, T. L., Matson, S. and Krieg, A. M. (1996b). "Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway." J Immunol **157**(12): 5394-402.

Yi, A. K., Tuetken, R., Redford, T., Waldschmidt, M., Kirsch, J. and Krieg, A. M. (1998b). "CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species." J Immunol **160**(10): 4755-61.

Yokoyama, W. M. and Seaman, W. E. (1993). "The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex." Annu Rev Immunol **11**: 613-35.

Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F. and Sprent, J. (1998). "Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15." Immunity **8**(5): 591-9.

Zhao, Q., Waldschmidt, T., Fisher, E., Herrera, C. J. and Krieg, A. M. (1994). "Stage-specific oligonucleotide uptake in murine bone marrow B-cell precursors." Blood **84**(11): 3660-6.

Zhu, F. G., Reich, C. F. and Pisetsky, D. S. (2001). "The role of the macrophage scavenger receptor in immune stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides." Immunology **103**(2): 226-34.

Zimmermann, S., Egeter, O., Hausmann, S., Lipford, G. B., Rocken, M., Wagner, H. and Heeg, K. (1998). "CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis." J Immunol **160**(8): 3627-30.

Zippelius, A., Pittet, M. J., Batard, P., Rufer, N., de Smedt, M., Guillaume, P., Ellefsen, K., Valmori, D., Lienard, D., Plum, J., MacDonald, H. R., Speiser, D. E., Cerottini, J. C. and Romero, P. (2002). "Thymic selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans." J Exp Med **195**(4): 485-94.

# Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

| | |
|---|---|
| ADCC | Antikörper-vermittelte zellgebundene Zytotoxizität |
| APC | Allophycocyanin |
| APC | Antigen-präsentierende Zelle |
| ATCC | *American Type Culture Collection* |
| BCG | *Bacille Calmette-Guérin* |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| cDNA | *copy*-Desoxyribonukleinsäure |
| CFSE | 5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester |
| CG | Cytosin-Guanin |
| CpG | Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid |
| cpm | *Counts per minute* |
| DC | Dendritische Zelle |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure |
| ELISA | *Enzyme-linked immunosorbent assay* |
| ERK 1/ 2 | *Extra-cellular signal-regulated kinase 1/ 2* |
| FACS | *Fluorescence-activated cell sorter* |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| FITC | Fluorescein-Isocyanat |
| FLU | Aus dem Influenza-Matrix-Protein abstammendes, HLA-A*0201-restringiertes Peptid Flu matrix$_{58-66}$ |
| GMCSF | *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* |
| HEV | Hohe endotheliale Venolen |
| HSA | Humanes Serum-Albumin |
| IκBα | *Inhibitor of NF-κBα* |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IL-1R | Interleukin-1-Rezeptor |
| IMDM | *Iscove's modified Dulbecco's medium* |
| IPC | Interferon-produzierende Zelle |
| IPP | Isopentenyl-Pyrophosphat |
| IRAK 1/ 4 | IL-1R-assoziierte Kinase 1/ 4 |
| IRF3 | *IFN regulatory factor 3* |
| JNK | c-Jun-N-terminale Kinase |
| KIR | *Killer-inhibitory receptor* |
| LAM | Lipoarabinomannan |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MACS | *Magnetic Activated Cell Sorting* |
| MALP-2 | *Macrophage-activating lipopeptide 2* |
| MDC | *Macrophage-derived chemokine* |
| MDC | Myeloide dendritische Zelle |
| MEL | Aus dem Melan-A-Protein abstammendes, HLA-A*0201-restringiertes Peptid Melan-A$_{26-35}$ A27L |
| MFI | Mittlere Fluoreszenzintensität |
| MHC | *Major histocompatibility complex* |
| Min | Minute(n) |
| Mio | Million(en) |
| MIP-1β | *Macrophage inflammatory protein 1β* |

| | |
|---|---|
| MIP-1α | *Macrophage inflammatory protein 1α* |
| mRNA | *Messenger RNA* |
| MyD88 | *Myeloid differentiation factor 88* |
| NF-κB | *Nuclear factor kappa B* |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzelle |
| ODN | Oligodesoxynukleotid |
| PAMP | *Pathogen-associated molecular pattern* |
| PBMC | Mononukleäre Zellen der peripheren Blutes |
| PBS | *Phosphate-buffered saline* |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PDC | Plasmazytoide dendritische Zelle |
| PE | Phycoerithrin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-A-Protein |
| PHA | Phytohämagglutinin |
| PI | Propidiumiodid |
| PMA | Phorbol-12-Myristat-13-Acetat |
| PRR | *Pattern-recognition*-Rezeptor |
| PTZ | Plasmazytoide T-Zelle |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RPMI | *Roswell Park Memorial Institute* |
| RT | Raumtemperatur |
| SEM | *Standard error of mean* |
| SLAM | *Signaling lymphocytic activation molecule* |
| SR-A | Scavenger-Rezeptor des Typs A |
| TARC | *Thymus- and activation-regulated chemokine* |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| Tetramere | Tetramere MHC-I-Komplexe |
| TH | T-Helfer |
| TIR | Toll/ IL-1R-Domäne |
| TIRAP | *TIR domain containing adapter protein* |
| TLR | *Toll-like*-Rezeptor |
| TNF-α | Tumor-Nekrose-Faktor α |
| TOPRO-3 | To-Pro-3-Iodid |
| TRAF 6 | TNFR-assoziierter Faktor 6 |
| TRIF | *TIR domain-containing adapter inducing IFN-β* |
| TZR | T-Zellrezeptor |

# Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Stefan Endres bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in die hervorragende Arbeitsatmosphäre seiner Gruppe. Insbesondere möchte ich mich für die außerordentliche Unterstützung und die Möglichkeit zum Besuch internationaler Kongresse bedanken.

Für die kontinuierliche Betreuung und die herausragende Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich meinen Betreuern PD Dr. Gunther Hartmann und Dr. Simon Rothenfußer ausdrücklich danken.

Ferner gilt mein Dank den Mitdoktoranden Andreas Towarowski, Stefanie Britsch und Anja Sarris für die herzliche Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung.

# Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als *Abstract* veröffentlicht:

1. **Hornung V**, Rothenfusser S, Ayyoup M, Krug A, Endres S, Speiser DE, Hartmann G.
   CpG oligonucleotides enhance recall and primary peptide specific human CTL responses
   *Cancer Vaccines 2000*
   *New York, USA*

2. **Hornung V**, Rothenfusser S, Ayyoup M, Krug A, Endres S, Speiser DE, Hartmann G.
   CpG-ODN enhance recall and primary peptide-specific human CTL responses
   *Joint Annual Meeting of Immunology of the German and Dutch Societies 2000*
   *Düsseldorf, Deutschland*

3. **Hornung V**, Rothenfusser S, Krug A, Jahrsdörfer B, Endres S, Hartmann G.
   *1. Kongress für Viruskrankheiten/ ConVir 2000*
   *München, Deutschland*

4. **Hornung V**, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G.
   Quantitative expression of TLR1-10 mRNA in cellular subsets of human PBMC and sensitivity to CpG-ODN
   *Activating Immunity with CpG Oligos: 2nd International Symposium 2001*
   *Amelia Island, USA*

5. **Hornung V**, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G.
   Quantitative expression of TLR 1-10 mRNA in cellular subsets of human PBMC and sensitivity to CpG-ODN
   *7th International Symposium on Dendritic Cells 2002*
   *Bamberg, Deutschland*

6. **Hornung V**, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G.
   Quantitative expression of TLR 1-10 mRNA in cellular subsets of human PBMC and sensitivity to CpG-ODN
   *Leiden International Medical Students Congress 2003*
   *Leiden, Niederlande*

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden internationalen Fachzeitschriften als Orginalarbeiten veröffentlicht:

1. Krug A, Rothenfusser S, **Hornung V**, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G.
   Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells.
   *European Journal of Immunology* 2001; 31(7):2154-63.

2. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, **Hornung V**, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G.
   Toll-like receptor expression reveals CpG-DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12.
   *European Journal of Immunology* 2001; 31(10):3026-37.

3. Rothenfusser S, **Hornung V**, Krug A, Towarowski A, Krieg AM, Endres S, Hartmann G.
   Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta.
   *European Journal of Immunology* 2001; 31(12):3525-34.

4. **Hornung V**, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G.
   Quantitative expression of TLR 1-10 mRNA in cellular subsets of human PBMC and sensitivity to CpG-ODN
   *Journal of Immunology* 2002; 168(9):4531-7.

5. Rothenfusser S, **Hornung V**, Ayyoub M, Britsch S, Towarowski A, Krug A, Lubenow N, Speiser D, Endres S, Hartmann G.
   CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8+ T-cell responses in vitro.
   *Blood* 2003; Nov 20

# Lebenslauf

## Veit Hornung

geboren am 15.04.1976 in München
als Sohn von Dr. med. dent. Christine Hornung und Klaus Hornung

## Schulische Ausbildung

| | |
|---|---|
| 1982 – 1984 | Grundschule Fürstenried, München |
| 1984 – 1986 | Grundschule Pullach, Pullach |
| 1986 – 1992 | Gymnasium Pullach, Pullach |
| 1992 – 1993 | Catholic Central High School, London Ontario Kanada |
| 1993 – 1995 | Gymnasium Pullach, Pullach |
| 1995 | Abitur am Gymnasium Pullach, Pullach (Note 1,7) |

## Zivildienst

| | |
|---|---|
| 1995 –1996 | Abteilung für Gefäßchirurgie,<br>Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt,<br>Klinikum der Universität München |

## Studium

| | |
|---|---|
| 1996 | Beginn des Studiums der Humanmedizin<br>an der Ludwig-Maximilians-Universität, München |
| 08/ 1998 | Physikum (Note 1,0) |
| 08/ 1999 | I. Staatsexamen (Note 1,0) |
| 03/ 2002 | II. Staatsexamen (Note 1,0) |
| 2002 – 2003 | Praktisches Jahr:<br>*Teil I:*<br>Innere Medizin am Massachusetts General Hospital<br>Harvard University, Boston, USA<br>*Teil II:*<br>Chirurgie am Universitätsspital Zürich<br>Universität Zürich, Zürich, Schweiz<br>*Teil III:*<br>Dermatologie an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie<br>und Allergologie, Klinikum der Universität München<br>Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland |
| 05/ 2003 | III. Staatsexamen (Note 1,0)<br>Abschluss des Studiums der Humanmedizin und Erlangung der<br>ärztlichen Teilapprobation (Gesamtnote 1,0) |

## Promotion

| | |
|---|---|
| 1999 - 2002 | Doktorarbeit in der<br>Abteilung für Klinische Pharmakologie,<br>Leiter: Prof. Dr. Stefan Endres<br>Medizinische Klinik Innenstadt,<br>Klinikum der Universität München<br>*Immunstimulatorische DNA:*<br>*Wirkung auf Effektorlymphozyten des angeborenen und adaptiven Immunsystems.* |

## Stipendien

| | |
|---|---|
| 2000 | Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes |
| 2002 | PJ-Stipendium im Rahmen der München-Harvard-Allianz |

## Beruf

| | |
|---|---|
| 06/ 2003 | Arzt im Praktikum in der<br>Abteilung für Klinische Pharmakologie,<br>Leiter: Prof. Dr. Stefan Endres<br>Medizinische Klinik Innenstadt,<br>Klinikum der Universität München |