

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München
Direktor: Univ.- Prof. Dr. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne)

Aktivierung von Zellen des humanen Immunsystems durch CpG-DNA

Marc Antonius Otto Bauer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. H. Kessler
2. Univ.- Prof. Dr. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne)

Die Dissertation wurde am 15.06.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 12.07.2000 angenommen.

meiner Familie und Sonja Oberpriller gewidmet

Für die Unterstützung dieser Arbeit möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. H. Wagner für die Möglichkeit an seinem Institut diese Dissertation zu erstellen und sein stetiges Interesse an meiner Arbeit

meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. G.B. Lipford für seine kompetente Betreuung, Diskussionsbereitschaft und Freundlichkeit

Herrn Prof. Dr. H. Kessler für seine Bereitschaft, diese externe Dissertation zu betreuen

allen Mitarbeitern des Instituts für den fachlichen Austausch und kameradschaftlichen Umgang

Abkürzungen:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
AP1	aktivierendes Protein 1
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	bovines Serumalbumin
CpG	Cytosin-Guanosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsorter
FKS	fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor
HBSS	„Hank’s balanced“ Salzlösung
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethanolsulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen
IFN	Interferon
IKK	I κ B Kinasekomplex
IL	Interleukin
I κ B	Inhibitor κ B
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
JNKK	JNK Kinase
KT	Kalbsthymus
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
NF κ B	nukleärer Faktor κ B
NK Zellen	natürliche Killerzellen

ODN	Oligodesoxyribonukleotid
PAMP	Pathogen assoziierte molekulare Muster
PBMZ	Peripherblut mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
pI:C	poly-Inosin : poly-Cytidyl-Säure
PRR	Muster erkennender Rezeptor
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPA	1,2-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetat
TRAF6	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG **1**

1.1	DIE WELT DER DNA	1
1.2	DNA UND DIE IMMUNOLOGIE	1
1.3	DAS CpG-PRINZIP	2
1.4	WAS BEDEUTET PATTERN RECOGNITION?	3
1.5	DIE ZELLEN DES ANGEBORENEN IMMUNSYSTEMS	4
1.6	DIE ZENTRALE ROLLE DER APZ	5
1.7	DIE VERTRETER DER APZ	7
1.8	EFFEKTE VON CpG-DNA AUF DAS IMMUNSYSTEM	8
1.9	SIGNALTRANSDUKTION DURCH CpG-DNA	10
1.10	CpG-DNA UND DAS HUMANE IMMUNSYSTEM.....	13

2 MATERIAL UND METHODEN **16**

2.1	MEDIEN UND REAGENZIEN	16
2.1.1	FICOLL-HYPAQUE LÖSUNG	16
2.1.2	AMMONIUMCHLORID LÖSUNG.....	16
2.1.3	„HANKS BALANCED“ SALZ LÖSUNG	16
2.1.4	PHOSPHAT GEPUFFERTE SALZLÖSUNG.....	17
2.1.5	TRYPsin/EDTA-LÖSUNG	17
2.1.6	EOSIN FÄRBE LÖSUNG	17
2.1.7	PARAFORMALDEHYD FIXIERLÖSUNG.....	17
2.1.8	5 x DNASEI PUFFER.....	18
2.1.9	ZELLKULTURMEDIUM.....	18

2.1.10	REAGENZIEN FÜR DIE ZELLKULTUR.....	19
2.1.11	DESOXYRIBONUKLEINSÄUREN UND OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE.....	19
2.1.12	HERSTELLUNG VERDAUTER ESCHERICHIA COLI DNA.....	20
2.1.13	ZYTOKINE.....	20
2.1.14	ZYTOKINE BLOCKIERENDE ANTIKÖRPER	21
2.2	ISOLATION VON PRIMÄREN IMMUNZELLEN UND ZELLINIEN.....	21
2.2.1	ISOLATION MONONUKLEÄRER ZELLEN AUS PERIPHEREM BLUT.....	21
2.2.2	ISOLATION VON T-LYMPHOZYTEN AUS PBMZ.....	22
2.2.3	ISOLATION VON MONOZYTEN AUS PBMZ.....	22
2.2.4	ISOLATION VON MONOZYTEN ODER B-LYMPHOZYTEN DEPLETIERTEN PBMZ.....	23
2.2.5	ISOLATION VON CD11c- LYMPHOIDEN DZ DEPLETIERTEN PBMZ.....	23
2.2.6	ISOLATION VON B-LYMPHOZYTEN AUS TONSILLEN	23
2.2.7	ISOLATION VON CD11c- LYMPHOIDEN DENDRITISCHEN ZELLEN AUS TONSILLEN	24
2.2.8	GENERIERUNG MYELOIDER DENDRITISCHER ZELLEN AUS BLUTMONOZYTEN.....	25
2.2.9	ZELLINIE.....	25
2.3	ZELLULÄRE ARBEITEN UND METHODEN.....	26
2.3.1	MESSUNG VON PROLIFERATION	26
2.3.2	BESTIMMUNG DER ZYTOKINPRODUKTION	26
2.3.3	MESSUNG DER OBERFLÄCHENANTIGENEXPRESSION	27
2.3.4	BESTIMMUNG DES ANTEILS LEBENDER ZELLEN	29
2.3.5	ZYTOLOGISCHE ANALYSEN	29
2.3.6	STIMULATION VON T-ZELLEN IN PBMZ	30
2.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG	30

3 ERGEBNISSE **31**

3.1	EFFEKTE AUF B-LYMPHOZYTEN.....	31
3.1.1	CpG-DNA INDUZIERT PROLIFERATION VON PBMZ.....	31
3.1.2	CpG-SPEZIFISCHE PROLIFERATION VON B-LYMPHOZYTEN	32
3.1.3	EXPRESSION VON KOSTIMULATORISCHEN UND ANTIGEN PRÄSENTIERENDEN OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN.....	36

3.1.4	EFFEKTE VON CHLOROQUIN AUF DIE AKTIVIERUNG VON B-ZELLEN.....	37
3.2	EFFEKTE AUF MONOZYTEN	39
3.2.1	ZYTOKINPRODUKTION DURCH PBMZ	39
3.2.2	CpG SPEZIFISCHE ZYTOKINSEKRETION DURCH MONOZYTEN	43
3.2.3	PRIMING DURCH IFN γ	45
3.2.4	EFFEKTE G REICHER SEQUENZEN	46
3.2.5	SYNERGISMUS MIT LPS	48
3.2.6	EXPRESSION VON KOSTIMULATORISCHEN UND ANTIGEN PRÄSENTIERENDEN OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN.....	50
3.2.7	BLOCKIERBARKEIT DER ZYTOKINFREISETZUNG DURCH CHLOROQUIN	52
3.3	EFFEKTE AUF DENDRITISCHE ZELLEN.....	53
3.3.1	MYELOIDE DZ.....	54
3.3.1.1	CHARAKTERISIERUNG DER GENERIERTEN ZELLEN.....	54
3.3.1.2	EFFEKTE DER CpG-ODN AUF MYELOIDE DZ	55
3.3.2	LYMPHOIDE CD11c- DZ.....	57
3.3.2.1	VORVERSUCHE IN PBMZ	57
3.3.2.2	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER LYMPHOIDEN CD11c- DZ.....	60
3.3.2.3	CpG-ODN UND BAKTERIELLE DNA VERHINDERN APOPTOSE DER DZ	62
3.3.2.4	CpG-DNA INDUZIERT MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DER CD11c- LYMPHOIDEN DZ	64
3.3.2.5	AKTIVIERUNG DER CD11c- LYMPHOIDEN DZ DURCH CpG-DNA.....	64
3.3.2.6	ZYTOKINFREISETZUNG REINER LYMPHOIDER CD11c- DZ.....	67
3.3.2.7	EINFLUSS VON IFN TYP I AUF B-ZELL-PROLIFERATION.....	69
3.4	INDIREKTE EFFEKTE VON CpG-OLIGONUKLEOTIDEN AUF ZELLEN DES IMMUNSYSTEMS.....	71
3.4.1	CpG-OLIGONUKLEOTIDE AKTIVIEREN T-ZELLEN NICHT DIREKT	71
3.4.2	CpG ABHÄNGIGE STIMULATION VON T-ZELLEN UND NK ZELLEN IN PBMZ.....	72
3.4.3	EINFLUSS VON CpG-OLIGONUKLEOTID AUF T _H 1/ T _H 2 AUSPRÄGUNG.....	74

4 DISKUSSION **76**

4.1	DAS CpG-MOTIV UND CpG-OLIGONUKLEOTIDE ALS MODELL FÜR BAKTERIELLE DNA	76
4.2	CpG-DNA ALS MITOGEN FÜR B-LYMPHOZYTEN.....	79
4.3	DIE ZIELZELLEN FÜR CpG-DNA SIND ANTIGEN PRÄSENTIERENDE ZELLEN.....	81
4.3.1	INDUKTION VON ANTIGEN PRÄSENTIERENDEN UND KOSTIMULATORISCHEN OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN.....	82
4.3.2	CpG-DNA INDUZIERT ZYTOKINSEKRETION	83
4.4	LYMPHOIDE CD11C- DENDRITISCHE ZELLEN ALS ZIELZELLEN FÜR PATHOGEN ASSOZIIERTE MOLEKULARE MUSTER	86
4.5	LYMPHOIDE CD11C- DZ IM VERGLEICH ZU MYELOIDEN DZ	88

5 ZUSAMMENFASSUNG **91**

6 LITERATURVERZEICHNIS **92**

1 EINLEITUNG

1.1 Die Welt der DNA

Ein Organismus gibt nicht eine Kopie seiner selbst an die nächste Generation weiter, sondern einen Bauplan. Dieser enthält die Information zum Aufbau eines Tochterorganismus. Die Idee, daß das Material dieser Anleitung Nukleinsäuren sind, geht auf die Entdeckung der Transformation (Griffith, 1928) zurück, d.h. der Übertragung genetischer Information von Bakterium zu Bakterium. Avery und seine Kollegen belegten 16 Jahre später Desoxyribonukleinsäure als transformierendes Prinzip. Doch erst die Klärung des Aufbaus dieses Makromoleküls durch Watson und Crick 1953 ebneten den Weg für neue Wissenschaftszweige. Die Genetik und die durch die Gentechnik zur Verfügung gestellten Methoden verändern unsere Welt in zunehmendem Maße. Das Gen als Einheit der Vererbung rückt für Forschung und Wirtschaft in das Zielfeld für Manipulation und Kontrolle. Nicht nur für Richard Dawkins mit seinem Buch „Das egoistische Gen“ leben wir in der Welt der DNA (Dawkins R., 1990).

1.2 DNA und die Immunologie

Die Erforschung der DNA hat wie in jeder anderen biologischen Disziplin auch in der Immunologie Einzug gehalten. Die Bedeutung der DNA für das Immunsystem war als Speicher und Transportvehikel genetischer Information anerkannt. Andererseits galt DNA als immunologisch inaktiv. Als Antigen wurde DNA mit Autoimmunität in Verbindung gebracht, wie im Fall des Krankheitsbildes Systemischer Lupus Erythematoses (Emlen et al, 1986).

Erste Befunde, daß „fremde“ DNA das Immunsystem beeinflusst, wurden, wenn auch später kontrovers diskutiert, bereits 1963 veröffentlicht (Rotem et al, 1963; Jensen et al, 1963; Isaacs et al, 1966). Pioniere der Arbeiten über das immunologische Prinzip von Nukleinsäuren

waren Yamamoto und Tokunaga. Ihre Forschungsarbeiten über die Antitumor-Aktivität von Bacillus Calmette-Guérin (BCG) führten zu dem Befund, daß eine DNA-Fraktion die Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK Zellen) verstärkt und zur Ausschüttung von Interferonen Typ I und II aus Blutzellen führt (Tokunaga et al, 1984; Yamamoto et al, 1988). Von Pisetsky wurde später die Beobachtung berichtet, daß bakterielle DNA, nicht aber Vertebraten-DNA eine immunologische Antwort generiert (Messina et al, 1991).

Die Frage, welche Strukturen der DNA aktivierend sind und wie es zu einer Unterscheidung zwischen bakteriellen oder vertebraten Ursprungs kommt, konnte durch synthetische Herstellung von Oligonukleotiden geklärt werden (Tokunaga et al, 1992). Krieg konnte durch gezielte Veränderung der Sequenz das Muster des aktivierenden DNA-Motivs erweitern und genauer charakterisieren (Krieg et al, 1995).

1.3 Das CpG-Prinzip

Die Charakterisierung der immunstimulatorischen Wirkung von DNA wurde durch die Verwendung von Oligonukleotiden im Rahmen der „antisense“-Technik beeinflusst. In diesem System werden Oligonukleotide (ODN), die in die Zellen aufgenommen werden, dazu eingesetzt, die Synthese spezifischer Proteine zu unterdrücken. Für eine Vielzahl dieser ODN und ihrer Kontrollen wurden Nebeneffekte wie z.B. die Proliferation von B-Lymphozyten beobachtet. Diese Phänomene ließen sich nicht über den „antisense“-Mechanismus erklären (Mojcik et al, 1993). Die Arbeiten von Pisetsky und seinen Kollegen stellten auf der Basis der B-Zell-Proliferation eine Verbindung zwischen „antisense“ Oligonukleotiden und bakterieller DNA her, jedoch ließen sie keine Schlüsse zu über die stimulierende DNA-Sequenz (Messina et al, 1991).

Bakterielle DNA war das Untersuchungsobjekt von Tokunaga und Yamamoto, die als Modell für das komplexe Molekül aus BCG DNA abgeleitete Oligonukleotide benutzten. Durch gezielten Sequenzvergleich war es ihnen möglich ein stimulierendes Motiv zu erarbeiten. Die so definierten Basenabfolgen sind palindromisch und zeigen stärkste Stimulation, wenn zentral ein CG-Dinukleotid vorhanden ist (Tokunaga et al, 1992).

Diese Einzelbeobachtungen wurden durch die Arbeit von Krieg und seinen Kollegen in einen Kontext zueinander gebracht und das Motiv in eine allgemein gültigere Form gefaßt. Es enthält ein zentrales CG-Dinukleotid, das ihm den Namen „CpG-Motiv“ gab und das essentiell für die Aktivität ist. Flankiert wird es am 5'-Ende von zwei Purinen (Pu), 3'-seitig von zwei Pyrimidinen (Pyr) (Krieg et al, 1995).

Wie aber läßt dieses Motiv die Unterscheidung von bakterieller und vertebrater DNA zu? Vergleicht man die Frequenz von CG-Dinukleotiden in DNA unterschiedlicher Spezies, so findet man sie in bakterieller DNA mit der statistisch zu erwartenden Frequenz von 1:16. In der DNA von Wirbeltieren liegt die Häufigkeit nur bei etwa 20% dieses Wertes (Bird, 1986). Die Frequenz von 5'- Pu- Pu- CG- Pyr- Pyr- 3' findet man in Wirbeltieren verglichen zu *Escherichia coli* noch seltener (Krieg et al, 1995).

Entscheidend für die immunstimulierende Aktivität ist der Zustand des zentralen CG. Ist das Cytosin methyliert, so wird die Aktivität fast vollständig zerstört. Während etwa 80 % der CG-Dinukleotide in vertebrater DNA methyliert sind, trägt nur ein Bruchteil der Cytosine in bakterieller DNA eine Methylgruppe. Diese Unterschiede im Muster der DNA verschiedener Spezies ermöglichen es dem Immunsystem von Säugern bakterielle DNA zu detektieren. Das Erkennen von Mustern zur Differenzierung von „Fremd“ und „Selbst“ stellt in der Immunologie ein besonderes Prinzip dar und wird unter dem Namen „pattern recognition“ zusammengefaßt.

1.4 Was bedeutet pattern recognition?

Das Immunsystem stützt sich auf zwei Bereiche, die angeborene und die adaptive Immunität. Beide Bereiche werden durch unterschiedliche Zelltypen repräsentiert.

Im adaptiven Immunsystem der T- und B-Lymphozyten finden sich Rezeptoren, die durch somatische Rekombination entstehen. Sie sind von unglaublicher Vielfalt und einzigartiger Spezifität gekennzeichnet. Kein Rezeptor ist identisch mit einem anderen, und die genetische Information für einen Rezeptor klonal definiert.

Phagozyten d.h. die Zellen des angeborenen Immunsystems bedienen sich einer anderen Gruppe von Rezeptoren. Diese wurden im Verlauf der Evolution selektiert, in der Keimbahn

festgelegt und werden nicht mehr durch Umstrukturierung der DNA verändert. Sie erkennen Pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMP = pathogen-associated molecular patterns) eines eindringenden Keimes über ihre „pattern recognition receptors“ (PRR) (Janeway, 1989). PAMP zeichnen sich durch die Eigenschaften aus, essentiell für die Physiologie des Pathogens zu sein, aber nicht durch den Wirtsorganismus synthetisiert zu werden. Während das adaptive Immunsystem durch Depletion und Toleranz lernt, nicht gegen körpereigene Antigene („Selbst“) zu reagieren (Shortman et al, 1990), sind die Zellen der angeborenen Immunität in der Lage „Fremd“ von „Selbst“ zu unterscheiden und entsprechend zu reagieren. Einer der prominentesten PRR ist CD14, der Rezeptor für Lipopolysaccharide, den Zellwandbestandteilen gram-negativer Bakterien (Pugin et al, 1994). LPS stimuliert die Zielzellen zur Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren, zur Hochregulation von Oberflächenmolekülen, zur Interaktion mit anderen Zellen, sowie zur Ausschüttung von Effektorzytokinen.

1.5 Die Zellen des angeborenen Immunsystems

Die Definition der Zellen der angeborenen Immunität geht auf die Arbeiten von Elie Metchnikoff im 19. Jahrhundert zurück. Danach können bestimmte Zellen, die sogenannten Phagozyten, Pathogene fressen und sie somit neutralisieren. Diese Art der Immunität steht sofort zur Verfügung, wirkt unspezifisch und bildet kein immunologisches Gedächtnis aus. Lang anhaltender Schutz gegenüber Krankheitserregern ist von ihr nicht zu erwarten. Dennoch stellt sie eine Grundvoraussetzung für den Erwerb von Langzeitimmunität dar (Fearon et al, 1996).

Die Freßzellen zeichnen sich nicht nur durch die Aufnahme von Pathogenen aus, sondern auch durch die Fähigkeit, Antigene zu prozessieren und zu präsentieren. Aufgrund dieser Eigenschaft werden sie als Antigen präsentierende Zellen (APZ) bezeichnet. Neben der Inaktivierung der Pathogene steht das ständige Sammeln von Antigenen aus der Umgebung im Vordergrund. Nach einem Prozessierungsschritt werden diese in einer Form präsentiert, die von Zellen des adaptiven Immunsystems erkannt werden kann. Zu den Antigen präsentierenden Zellen zählt man Monozyten und die aus ihnen hervorgehenden

Makrophagen, sowie die heterogene Gruppe der dendritischen Zellen. Eine interessante Überschneidung der APZ mit Komponenten des adaptiven Immunsystems stellen die B-Zellen dar. Auch wenn sie im klassischen Sinne nicht zur Phagozytose befähigt sind, können sie über ihre spezifischen Rezeptoren lösliche Antigene aufnehmen, prozessieren und präsentieren.

1.6 Die zentrale Rolle der APZ

Die durch PRR in APZ ausgelösten Signale sind teilweise bekannt. Trifft z.B. eine dendritische Zelle in der Peripherie auf ein eindringendes Pathogen, so wird dieses phagozytiert. An diesem Vorgang sind bereits PRR beteiligt (Stahl et al, 1998).

PRR signalisieren der Zelle, proinflammatorische Zytokine zu produzieren. Zu ihnen zählt man Interleukin 1 und Interleukin 6, die als erste Front der Abwehr zur Ausschüttung von akuten Phase-Proteinen führen und das Komplementsystem aktivieren (Akira et al, 1996). Ein weiteres wichtiges Zytokin ist Tumor Nekrose Faktor (TNF). Es führt zu lokalen Entzündungsreaktionen und permeabilisiert die Blutgefäße, was den Übertritt von Immunzellen ins Gewebe erleichtert (McEver et al, 1995). Die Wanderung dieser Immunzellen wird von weiteren Produkten der APZ gelenkt, sogenannten Chemokinen wie Interleukin 8. Von den APZ ausgeschüttete Interferone α und β verhindern die Replikation von Viren und aktivieren NK Zellen, zytotoxische Zellen des angeborenen Immunsystems (Pestka et al, 1987; Ortaldo et al, 1984).

Die APZ selbst verlassen den Ort der Entzündung und begeben sich zu den drainierenden Lymphknoten. Während ihrer Wanderung maturieren sie und regulieren Oberflächenmoleküle hoch wie CD80, CD86, CD40, MHC Klasse I und II. Lymphknoten sind hochspezialisierte Organe, in denen durch Zellinteraktionen zwischen APZ und T- und B-Lymphozyten die adaptive Immunität generiert wird (Macatonia et al, 1987; Cumberbatch et al, 1991; Rattis et al, 1996).

Die T-Zelle erkennt mittels ihres T-Zell-Rezeptors Antigen nur im Kontext mit MHC Molekülen. Dieses Signal reicht allerdings nicht für eine produktive Antwort der T-Zellen aus. Zusätzlich benötigen sie sogenannte kostimulatorische Signale über CD80 oder CD86. Die

PAMP aktivierte APZ stellt beide dieser Signale zur Verfügung. Dieser Mechanismus garantiert, daß eine T-Zelle in der Regel beide Aktivierungssignale erhält, wenn das erkannte Peptid von einem Pathogen stammt, das auch kostimulatorische Aktivität induziert (Liu et al, 1992).

Neben den Komponenten für die direkte Zell-Zell-Interaktion mit T-Zellen, stellt die aktivierte APZ lösliche Mediatoren zur Verfügung mittels derer die Entwicklung der T-Zell-Anwort kontrolliert und gelenkt wird. CD4 T-Lymphozyten können in zwei Subpopulationen unterteilt werden, T_H1- und T_H2-Zellen. Während die Differenzierung zu T_H1 primär zu zellvermittelter Immunität führt, ruft die selektive Produktion von T_H2-Lymphozyten vor allem eine humorale Immunität hervor. Interleukin 12, ein weiteres Produkt PAMP aktivierter APZ, favorisiert die Entwicklung von T_H1-Zellen und von zytotoxischen CD8 T-Zellen (Hsieh et al, 1993). Aktivierte T-Lymphozyten können nach einer Phase der klonalen Expansion den Lymphknoten verlassen und zur gezielten Elimination des Pathogens den Ort der Entzündung aufsuchen. Für Interferon α und β wurde gezeigt, daß sie die Differenzierung von menschlichen CD4 T-Lymphozyten in T_H1-Zellen fördern (Rogge et al, 1998). Weiterhin unterstützen Interferon α und β die klonale Expansion von B-Zellen (Hibbert et al, 1999).

Die Aktivierung von APZ über ihre „pattern recognition receptors“ hat somit weitreichende Folgen. Neben den Einflüssen auf Komponenten der unspezifischen Immunität wie Komplementsystem und NK Zellen, die schnell und effektiv wirken, schafft sie die Basis für die Generierung spezifischer Antworten durch T-Effektor-Zellen und verstärkt die humorale Antwort der B-Lymphozyten. Beide dienen als Basis für das immunologische Gedächtnis. Ohne „pattern recognition“, der aktiven Unterscheidung von „Fremd“ und „Selbst“, könnte das Immunsystem seine Umgebung nicht „wahrnehmen“ und keinen langanhaltenden Schutz ihrgegenüber erzeugen.

1.7 Die Vertreter der APZ

Unter Antigen präsentierenden Zellen fast man drei Zelltypen zusammen, die B-Lymphozyten, Monozyten / Makrophagen und dendritische Zellen. Sie unterscheiden sich stark in ihren Fähigkeiten, Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und vor allem zusätzliche aktivierende Faktoren zur Verfügung zu stellen.

Die unumstrittene Hauptaufgabe von B-Zellen ist die Generierung von spezifischen Antikörpern. Diese ermöglichen ihr, sehr spezifisch Antigen über ihren B-Zell-Rezeptor, membranständige Immunglobuline, aufzunehmen und über MHC-Komplexe zu präsentieren (Chesnut et al, 1982). Die Bereitstellung von Kostimulation und die Fähigkeit zur Zytokinproduktion sind aber nur gering ausgeprägt.

Monozyten des Blutes und die aus ihnen abgeleiteten Makrophagen haben eine Vielzahl von Möglichkeiten entwickelt, Mikroorganismen aufzunehmen (Aderem et al, 1999). Sind diese einmal in Vesikeln internalisiert, so werden sie mit unterschiedlichsten Mechanismen geschädigt oder abgetötet. Proteinkomponenten werden prozessiert und im Kontext mit MHC-Molekülen präsentiert. Gleichzeitig induzieren Komponenten der Bakterien die Freisetzung einer Vielzahl von Zytokinen. Monozyten und Makrophagen sekretieren Mediatoren, die in der angeborenen Immunität von entscheidender Bedeutung sind. Des weiteren stellen sie Zytokine zur Verfügung, die vor allem T-Zellen beeinflussen, und exprimieren Oberflächenmoleküle, die für die Kostimulation benötigt werden.

Dendritische Zellen sind eine sehr heterogene Population von Immunzellen. Das Fehlen von Oberflächenmolekülen, die sie eindeutig identifizieren, und ihr seltenes Vorkommen stellt das größte Problem ihrer Charakterisierung dar. Dennoch sind viele Eigenschaften dieses äußerst interessanten Zellverbundes aufgeklärt. Ihren Namen erhielten sie durch ihre Erscheinungsform als Zellen mit extrem starken Verzweigungen. Dadurch wird ihre Oberfläche vergrößert und somit für die Aufnahme von Mikroorganismen und die Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems optimiert. Sie sind in der Lage große Mengen an Zytokinen zu produzieren.

Man unterteilt sie in myeloide und lymphoide dendritische Zellen (DZ). Myeloide dendritische Zellen tragen den GM-CSF Rezeptor und Oberflächenantigene wie CD11c, CD13 und CD33 (O'Doherty et al, 1994). CD11c, CD13 und CD33 sind jedoch in ihrer Ausprägung variabel und man findet unterschiedliche Kombinationen. Die myeloiden DZ

lassen sich direkt aus Geweben oder peripherem Blut isolieren oder können aus Blutmonozyten mittels der Zytokine GM-CSF und IL4 generiert werden (Zhou et al,1996). Eine zweite, weniger gut definierte Gruppe dendritischer Zellen sind die sogenannten lymphoiden DZ. Sie zeichnen sich durch Expression von CD4 aus und konnten bisher aus peripheren Blut und lymphatischen Organen isoliert werden (Kohrgruber et al, 1999). Aufgrund der Expression von CD11c lassen sie sich weiter unterteilen. CD11c positive lymphoide DZ ähneln myeloiden DZ, da sie GM-CSF abhängig sind und CD13, sowie CD33 exprimieren. CD11c negative lymphoide DZ zeigen einen vollständig unterschiedlichen Phänotyp. Sie sind abhängig von IL3 und exprimieren kein CD13 und CD33. Sie wurden bisher in der Literatur unterschiedlich benannt wie z.B. plasmazytoide T-Zellen (Grouard et al, 1997), natürliche Interferon TypI produzierende Zellen (NIPC) (Fitzgerald-Bocarsly et al, 1993) oder Vorläufer dendritische Zellen Typ2 (pDC2) (Rissoan et al, 1999).

1.8 Effekte von CpG-DNA auf das Immunsystem

Die meisten der bisher beschriebenen Effekte von CpG-DNA auf Zellen des Immunsystems stammen aus Versuchen mit Mäusen. So konnte gezeigt werden, daß bakterielle DNA oder synthetische CpG-ODN B-Zellen zur polyklonalen Proliferation und Sekretion von Antikörpern stimulieren (Krieg et al, 1995). In bestimmten B-Zellen führt ein Signal über den B-Zell-Rezeptor zur Apoptose. Dieser programmierte Zelltod wird durch CpG-ODN verhindert. Dieser Schutz vor Apoptose geht einher mit der erhöhten Synthese von Zellzyklus kontrollierenden Proteinen wie Bcl-2 und Bcl-x₁ (Yi et al, 1996a).

In Makrophagen induziert CpG-DNA die Sekretion von IL1, IL6, IL12 und TNF und fördert die Expression von CD40, CD80 und CD86 (Stacey et al, 1996; Sparwasser et al, 1997b; Lipford et al, 1997b). Dabei zeigt CpG-DNA synergistische Wirkung mit LPS (Cowdery et al, 1996; Sparwasser et al, 1997a).

Immature dendritische Zellen, wie man sie z.B. in der Epidermis findet, können sehr effizient Antigen aufnehmen. Sie sind jedoch schwache Antigen präsentierende Zellen, da die Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen noch gering ist. Erst die Aktivierung und Ausreifung befähigt sie zu produktiver Interaktion mit T-Lymphozyten. Für immature

dendritische Zellen, die aus Knochenmark generiert wurden, stellt CpG-DNA neben LPS in vitro eine Maturierungssignal dar (Sparwasser et al, 1998). Die so aktivierten DZ exprimieren CD86, CD40 und MHC Klasse II und können T-Zellen effizient stimulieren. Parallel dazu führt die Aktivierung zur Ausschüttung großer Mengen an IL12. Ähnliche Ergebnisse konnten mit ex vivo DZ und in vivo gezeigt werden (Jakob et al, 1998). Während Peptidpräsentation und Kostimulation essentiell für die Aktivierung von T-Zellen ist, stellt IL12 ein Schlüsselzytokin für die T_H1 Entwicklung dar.

Die Applikation von Antigen eines Pathogens alleine führt nicht zu protektiver Immunität gegenüber dem Krankheitserreger. Für die erfolgreiche Vakzinierung ist der Zusatz eines Adjuvans nötig, das das Immunsystem ausreichend stimuliert. So konnten in Experimenten zur Immunisierung mit Modellantigenen wie Ovalbumin, Hepatitis B Protein oder Hühnereilysozym CpG-ODN als Adjuvans erfolgreich für die Induktion von zytotoxischen T-Zellen und der spezifischen Antikörperproduktion des Isotyps IgG2a eingesetzt werden (Lipford et al, 1997a; Chu et al; 1997; Davis et al, 1998). Beide werden als Marker für T_H1 Immunantworten angesehen.

Leishmania major Infektion in genetisch T_H2 prädispositionierten Balb/c Mäusen führen zum Versterben der Tiere. Die Entwicklung von T_H1 Antworten jedoch sichert das Überleben. Die Gabe von CpG-ODN führten zu protektiven und sogar kurativen Effekten in diesem Infektionsmodell (Zimmermann et al, 1998). Ebenso wurden in T_H2 dominierten Krankheitsbildern wie Asthma Symptomverbesserungen durch CpG-DNA belegt (Kline et al, 1998).

Die Auswirkungen von CpG-DNA auf das Immunsystem sind aber nicht nur positiver Art. Bakterieller CpG-DNA wird eine Rolle bei der Entwicklung des septischen Schocks bei Infektion mit gram positiven Erregern zugeschrieben (Sparwasser et al, 1997a).

1.9 Signaltransduktion durch CpG-DNA

In vorangegangenen Kapiteln wurden das Konzept von CpG-DNA als Pathogen assoziiertes Molekül und die Antworten bestimmter Immunzellen und des Immunsystems vorgestellt. Wie aber wird die Information, die CpG-DNA birgt, in der Zelle umgesetzt? Zellen stehen dafür eine Vielzahl von Wegen zur Verfügung, die die Weiterleitung und die Verarbeitung von Signalen erlauben.

Einer dieser Signaltransduktionswege verläuft über den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Grilli et al, 1993; Kopp et al, 1995). Die Aktivität von NF- κ B wird über eine Familie inhibitorischer Moleküle I κ B kontrolliert (Ghosh et al, 1998). Stimulation z.B. durch IL1 führt zu Phosphorylierung und darauffolgende Degradation von I κ B. Somit freigesetztes NF- κ B kann im Zellkern an NF- κ B Bindungsstellen die Gentranskription aktivieren. I κ B ist Phosphorylierungssubstrat für I κ B Kinasen (IKK α und IKK β) (DiDonato et al, 1997; Karin, 1998). IKK wiederum werden durch NF- κ B induzierende Kinase (NIK) aktiviert (Regnier et al, 1997). Die Anbindung der Kinasenkaskade an den IL1 Rezeptor erfolgt über das Adaptorprotein MyD88, die IL1 Rezeptor assoziierte Kinasen (IRAK-1,-2 und -m) und TNF Rezeptor assoziiertes Protein 6 (TRAF6) (Wesche et al, 1997).

Für den PAMP LPS konnte erst kürzlich gezeigt werden, daß die Signaltransduktion über TLR (toll-like receptors) erfolgt und die dadurch resultierende NF- κ B Aktivierung wie bei IL1 abhängig von MyD88, TRAF6, NIK und IKK ist (Kirschning et al, 1998; Yang et al, 1998). Daß dieser Weg der Signalübertragung von CpG-DNA beschränkt wird, konnte durch die CpG induzierte Degradation von I κ B α und I κ B β (Yi et al, 1998a; Hacker et al, 1998; Hacker et al, 1999) und die Translokation von NF- κ B in den Kern (Sparwasser et al, 1997b; Hacker et al, 1998; Hacker et al, 1999) gezeigt werden. Ebenso konnte die Beteiligung von MyD88 und TRAF6 an der Signalweiterleitung gezeigt werden (Hacker, unveröffentlichte Ergebnisse).

Eine weitere Möglichkeit der Signaltransduktion sind die Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK-Wege). Sie sind aufgebaut als Kaskaden Serin/Threonin spezifischer Kinasen und werden nach der terminalen Kinase benannt z.B. extrazelluläres Signal regulierte Kinasen (ERK), c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Weg oder p38 MAPK-Weg. Die terminalen Kinasen

aktivieren Komponenten des Transkriptionsfaktors AP1 durch Phosphorylierung. Der ERK-Weg wird v.a. durch Wachstumsfaktoren aktiviert, die JNK- und p38 MAPK-Pfade übertragen Signale von Stimuli wie IL1 oder LPS (Roussel et al, 1998; Bird et al, 1994; Hambleton et al, 1996). Durch die Verwendung von CpG-ODN konnte die Phosphorylierung von c-Jun, einem Element von AP1, und der Kaskadenkomponenten wie JNK und die JNK Kinase (JNKK), p38 MAPK und ERK demonstriert werden (Hacker et al, 1998; Hacker et al, 1999).

Über die proximalen Elemente, die an der Signalübertragung durch CpG-DNA beteiligt sind, ist bisher wenig bekannt. Einige Oberflächenrezeptoren wie der Scavengerrezeptor und Mac-1 wurden mit der Aufnahme von DNA in die Zelle in Verbindung gebracht, zeigen jedoch keine Sequenzspezifität (Kimura et al, 1994; Benimetskaya et al, 1997). Dennoch ist die unspezifische Aufnahme in endosomale Kompartimente eine Voraussetzung für die Aktivität (Hacker et al, 1998). Immobilisierte ODN waren nicht in der Lage B-Zell-Proliferation zu induzieren (Krieg et al, 1995).

Nach erfolgter Aufnahme ist die Azidifizierung der Endosomen entscheidend für die Signalinduktion. Die Blockade der endosomalen Ansäuerung mittels Chloroquin hemmt nicht die Aufnahme der ODN, verhindert aber die Signalweiterleitung (Hacker et al, 1998; Macfarlane et al, 1998; Krieg et al, 1998; diese Arbeit). Auf der Basis dieser Befunde wird ein säuresensitiver endosomaler Rezeptor vermutet, der CpG-DNA detektieren kann. Seine molekularen Eigenschaften sind bis heute noch unbekannt, seine Charakterisierung stellt aber ein Feld intensiver Forschung dar.

Abbildung 1

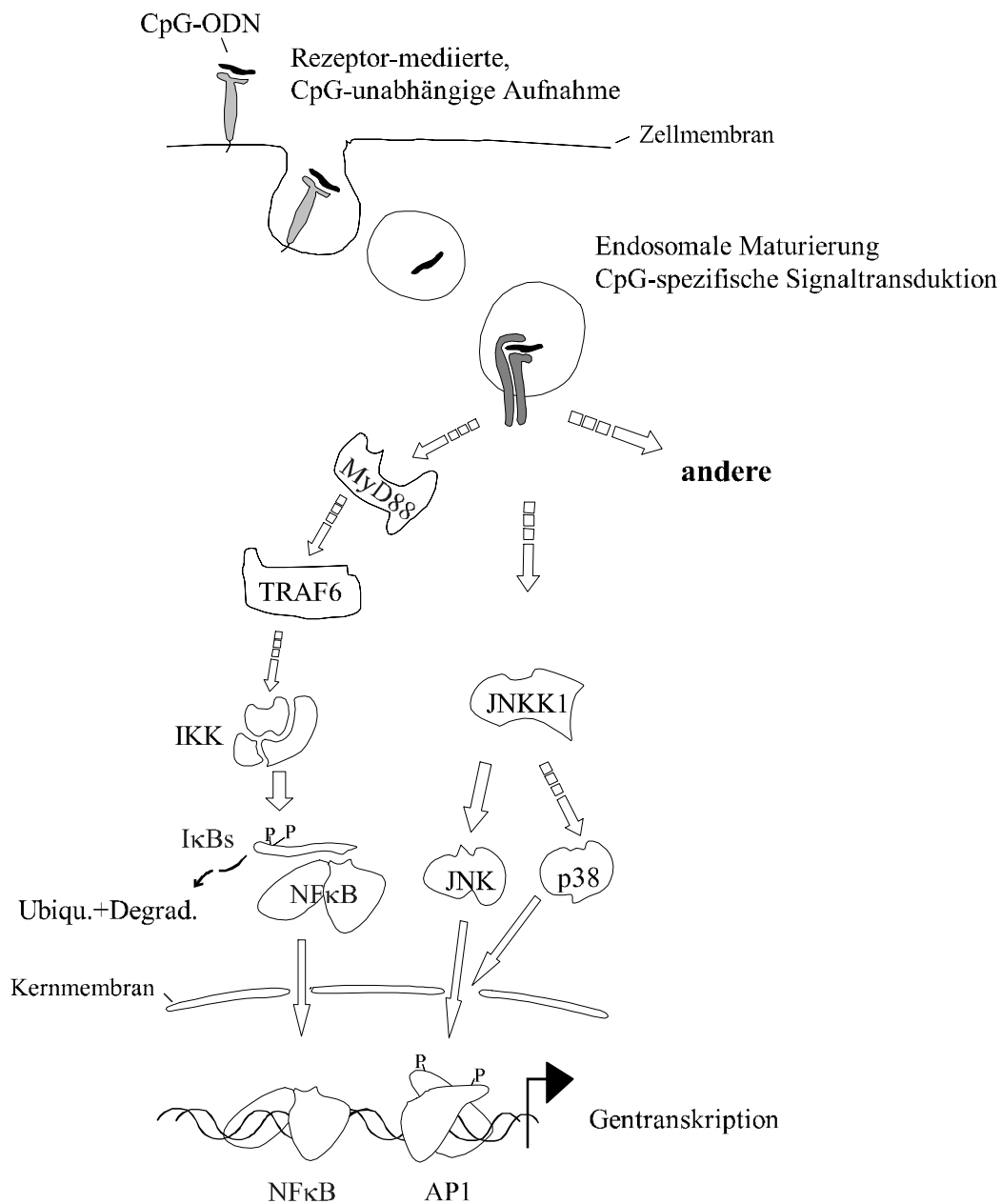


Abbildung 1: Modell der CpG-DNA induzierten Signaltransduktion

CpG-ODN werden durch CpG-unabhängige Rezeptoren in Endosomen aufgenommen. Ein pH-abhängiger Schritt führt zur Signaltransduktion durch einen postulierten CpG-spezifischen Rezeptor. Die Signalweiterleitung erfolgt über Komponenten der NFκB- und AP1-Wege. Die Transkriptionsfaktoren werden aktiviert und binden an entsprechende Promotorregionen responsiver Gene. Die Moleküle in dieser Übersicht sind als Symbole zu verstehen und repräsentieren nicht die natürliche Gestalt. (NFκB = nukleärer Faktor κB; IκB = Inhibitor κB; IKK = IκB Kinasekomplex; TRAF6 = TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6; AP1 = aktivierendes Protein 1; JNK = c-Jun N-terminale Kinase; p38 = p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase; JNKK = JNK Kinase)

(Abbildung freundlicher Weise von Hans Hacker zur Verfügung gestellt)

1.10 CpG-DNA und das humane Immunsystem

Die Einflüsse bakterieller DNA auf Immunzellen wurde bisher sehr intensiv in Mäusen und *in vitro* an Immunzellen der Maus analysiert. Das Modellsystem der Maus bietet einige Vorteile wie die Verfügbarkeit von Inzuchtstämmen und Mausstämmen mit genetisch definierten Defekten einzelner Proteine („knockout“-Mäuse). In keinem anderen Tiermodell wurden die zellulären und molekularen Regelmechanismen präziser definiert. Schließlich liegen gegen die meisten der molekular definierten Proteine monoklonale Antikörper vor.

Obwohl grundsätzlich die zellulären und molekularen Mechanismen des Immunsystems der Maus auf den Menschen übertragen werden können, stellen sich dem im konkreten Fall immer wieder Probleme. Als Erklärung wird angeboten, daß der klaren Inzuchtsituation der Maus die heterogene Menschenpopulation gegenüber steht. Gerade für immunologische Reaktionen scheinen die Historie des Einzelindividuums von entscheidender Bedeutung zu sein. Demzufolge wird gefordert, daß in der Maus erhobene „Immunsystem-Daten“ soweit wie möglich an Zellen des Menschen (*ex vivo*) oder am Menschen selbst (*in vivo*) reproduziert werden müssen.

Daten über die Wirksamkeit von CpG-DNA auf Zellen des humanen Immunsystems sind bisher in der Literatur nur in geringem Umfang vorhanden, auch wenn erste Ergebnisse mit menschlichen Zellen gewonnen wurden. So wurde die Antitumor Aktivität von bakterieller DNA und Oligonukleotiden anhand Zellen humanen Blutes demonstriert (Yamamoto et al, 1994; Ballas et al, 1996). Zurückzuführen war sie auf die Produktion von IFN α und IFN β und die daraus resultierende NK Zell-Aktivierung.

Branda und Kollegen konnten zeigen, daß ein HIV rev-antisense Oligonukleotid die Proliferation von B-Zellen induziert. Eine Verbindung zu in den ODN enthaltenen CpG-Motiven wurde nicht untersucht (Branda et al, 1996). Die DNA initiierte polyklonale Proliferation von B-Zellen und die Hochregulation des kostimulatorischen Oberflächenproteins CD86 und des Aktivierungsmarkers CD25 konnte durch andere Gruppen ebenfalls demonstriert werden (Liang et al, 1996). Jedoch fehlte auch hier die schlüssige Beweisführung für die CpG-Motive als immunstimulatorische Anteile der DNA.

Durch die Transfektion von CpG-Motiven enthaltenden Vektoren und ODN, die in Vesikeln kationischer Lipide eingeschlossen waren, konnte eine Zunahme an IFN α und β und möglicher Weise IL12p40 auf der Basis von mRNA und Proteinsekretion durch humane

Monozyten erreicht werden (Sato et al, 1996; Roman et al, 1997). Die CpG-ODN induzierte Produktion von Interleukin 6 und die Proliferation in Kulturen humaner Blutzellen konnte durch die Zugabe von Chloroquin und strukturverwandten Substanzen unterdrückt werden, wobei hier weder der reagierende Zelltyp noch die CpG-Spezifität untersucht wurden (Macfarlane et al, 1998). CpG-Motive, die in DNA von Patienten mit Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) enthalten sind, wurden mit der Hochregulation von MHC Klasse II und des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf Monozyten, sowie dem Anstieg von IL12 und IFN γ mRNA in Verbindung gebracht. Eine Beteiligung an der Pathogenese von SLE wurde diskutiert (Sato et al, 1999).

Erst in jüngster Zeit häufen sich Berichte, die sich mit CpG spezifischen Effekten auf definierte humane Zellpopulationen beschäftigen und die Auswirkungen in komplexeren Zellverbänden beschreiben. So konnten gereinigte NK Zellen direkt zur IFN γ Sekretion angeregt werden. Auf T-Zellen wirkten CpG-ODN kostimulatorisch mit einem TZR-Signal (Iho et al, 1999). Im Gegensatz dazu wurde von Kranzer und Kollegen eine Abhängigkeit der NK und T-Zell-Aktivierung von IL12 und IFN α und β postuliert, CpG induzierten Produkten von Antigen präsentierenden Zellen (Kranzer et al, 2000).

Erste Hinweise auf das Potential von CpG-Oligonukleotiden, humane T-Zellen zu einem T_H1 Typ zu differenzieren, wurden mit Blut allergischer Individuen erhoben. CpG abhängig kam es zur Expression von IL12 und IL18 mRNA in PBMZ, die auf dendritische Zellen zurückgeführt werden konnte, beides Zytokine, die mit der Differenzierung zu T_H1 assoziiert werden. Die Erhöhung Allergen spezifischer Antikörper des Isotyps IgG und IgM und die Reduktion des gesamt IgE lassen auf mögliche Anwendung zur Behandlung von Allergien hoffen (Bohle et al, 1999). In einem Allergen spezifischen System konnte durch die Gabe von CpG-DNA ein T_H2 Phänotyp in eine Antwort der CD4 T-Zellen mit T_H1-Zytokinprofil verändert werden. Diese Beeinflussung der Zytokinausschüttung war abhängig von IL12, IFN α und γ (Parronchi et al, 1999).

Auf einer nicht genauer definierten dendritischen Zellpopulation aus dem Blut konnten CpG spezifische Effekte wie Überleben, Reifung und die Hochregulation von ICAM-1, CD40, CD86 und MHC Klasse II dargestellt werden (Hartmann et al, 1999).

Ziel dieser Arbeit war es, Systeme für den Nachweis CpG spezifischer Antworten humaner Immunzellen zu etablieren und diese zu beschreiben. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf primären Antigen präsentierenden Zellen, die ex vivo isoliert wurden. Der Reindarstellung der unterschiedlichen Zellpopulationen galt dabei besonderes Interesse, um direkte Effekte der DNA von indirekten zu unterscheiden. Zellen, die in komplexen Verbunden Responsivität zeigten, wurden isoliert und charakterisiert. Die Spezifität des CpG-Motivs wurde mit verschiedenen Untersuchungsmethoden bewiesen und die Optimierung der Oligonukleotide wurde angestrebt. Dabei wurden die CpG-Oligonukleotide nicht nur als Agens mit möglicher Adjuvanswirkung und somit therapeutischem Nutzen verstanden, sondern auch als Modell für bakterielle DNA, um die zellulären und molekularen Vorgänge einer Infektion zu erforschen. Vergleiche mit anderen Pathogen assoziierten Molekülen wurden angestellt und Interaktionen aufgeklärt. Neben der Charakterisierung unmittelbarer Wirkungen auf isolierte Zellen, boten die Systeme die Möglichkeit, die Kommunikation der Immunzellen über die induzierten Mediatoren zu studieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Medien und Reagenzien

2.1.1 Ficoll-Hypaque Lösung

Für die Aufreinigung von humanen mononukleären Zellen aus peripherem Blut wurden rote Blutkörperchen sowie Granulozyten durch Zentrifugation über Ficoll-Hypaque Lösung mit einer Dichte von 1,077 g/l (Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland) abgetrennt.

2.1.2 Ammoniumchlorid Lösung

Tris gepufferte 140 mM Ammoniumchlorid Lösung wurde für die Lyse kontaminierender roter Blutkörperchen eingesetzt. Zur Herstellung wurde 8,3g NH_4Cl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in 1000 ml $\text{Aqua}_{\text{bidest}}$ gelöst und 111 ml Tris (170 mM) gepuffert. Die Lösung wurde auf einen pH von 7,2 eingestellt und steril filtriert.

2.1.3 „Hanks balanced“ Salz Lösung

Bei „Hanks balanced“ Salz Lösung (HBSS) handelt es sich um eine komplexe Salzlösung, die mit Bicarbonat (350 mg/l) und den unter 2.1.9 beschriebenen Antibiotika versetzt und auf pH 7,2 titriert wurde. Sie wurde zum Abtrennen der Blutplättchen von mononukleären Zellen verwendet.

2.1.4 Phosphat gepufferte Salzlösung

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) wurde von Biochrom, Berlin, Deutschland, bezogen. Sie enthält 4 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl und 20 mM KCl bei einem pH von 7,2. Zusätzlich wurden Antibiotika wie unter 2.1.9 beschrieben zugegeben.

2.1.5 Trypsin/EDTA-Lösung

Zum Ablösen von adhären wachsenden Zellen wurden die Zellen 5 min bei 37°C mit Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland) bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit RPMI + 10% FKS gewaschen.

2.1.6 Eosin Färbelösung

2 g Eosin (Merck, Darmstadt, Deutschland), 250 mg Natriumazid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 50 ml FKS wurden langsam in 450 ml 0,9% NaCl-Lösung eingerührt, filtriert und unsteril bei 4 °C gelagert. Diese Lösung diente zur Vitalfärbung von Zellsuspensionen in Verhältnissen zwischen 10:1 bis 1:1.

2.1.7 Paraformaldehyd Fixierlösung

1 g Paraformaldehyd (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde in 100 ml PBS bei 56 °C unter Rühren über Nacht gelöst. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0,2 µm Filter filtriert und bei 4 °C gelagert.

2.1.8 5 x DNaseI Puffer

Folgende Reagenzien wurden gemischt, die Lösung steril filtriert und bei -20°C in Aliquots gelagert.

Tris-HCl (Tris- hydroxymethyl- aminomethan), pH 7,5	250 mM
Magnesiumchlorid	50mM
BSA (Rinderserumalbumin)	250 $\mu\text{g/ml}$

2.1.9 Zellkulturmedium

Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit folgenden Zusätzen verwendet:

HEPES (Hydroxyethylpiperazinethanolsulfonsäure)	2,4 g/l	
Bicarbonat	1,2 g/l	
Antibiotika:	Penicillin G	60 $\mu\text{g/ml}$
	Tylosintartrat	10 $\mu\text{g/ml}$
	Streptomycinsulfat	125 $\mu\text{g/ml}$
L-Glutamin	10 mM	
2-Mercaptoethanol	50 μM	
Fötale Kälberserum (FKS)	10% (vol/vol)	
oder autologes Serum	5% (vol/vol)	
Pyruvat	1 mM	(optional)
pH 7,2		

Die Lagerung erfolgte steril bei 4°C .

2.1.10 Reagenzien für die Zellkultur

poly-Inosin : poly-Cytidyl-Säure (pI:C), eine doppelsträngige heteropoly Ribonukleinsäure, Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil von *Escherichia coli*, Serotyp 0127:B8, sowie Chloroquin wurden ebenfalls von Sigma, Deisenhofen, Deutschland bezogen.

1,2-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetat (TPA) und Ionomycin sind Produkte der Firma Calbiochem, Bad Soden, Deutschland.

Die Reagenz 406 wurde freundlicher Weise von Professor A.J. Ulmer (Forschungszentrum Borstel, Borstel, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

2.1.11 Desoxyribonukleinsäuren und Oligodesoxyribonukleotide

Escherichia coli Stamm B und Kalbsthymus Desoxyribonukleinsäuren (DNA) wurde von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Um mögliche Kontaminationen der *Escherichia coli* DNA (EC DNA) auszuschließen wurde sie erneut in Aqua_{bidest} gelöst, phenolisch extrahiert und mit Acetat und Ethanol in der Kälte gefällt. Die präzipitierte DNA wurde nach der Trocknung in Medium ohne FKS aufgenommen.

Lyophilisierte Oligonukleotide wurden bei 65°C für 30 min in Aqua_{bidest} gelöst und sterilfiltriert.

Sowohl DNA als auch Oligonukleotide wurden bei -20°C in Aliquots gelagert.

Folgende Oligodesoxyribonukleotide (ODN) wurden in Versuchen verwendet:

Bezeichnung	Sequenz
2006	5'- TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT -3'
2006K	5'- TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT -3'
DSP30	5'- TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTGCC -3'
DSP30K	5'- TGCTGCCTGTCTCCCCTTCTTCTTGCC -3'
1668	5'- TCCATGACGTTCCCTGATGCT -3'

Bezeichnung	Sequenz	
1668K	5'- TCCATGAGCTTCCTGATCCT	-3'
AP1	5'- GCTTGATGACTCAGCCGGAA	-3'
3006	5'- TTGTCGTTTTGTCGTTTTGTGCT	-3'
3006K	5'- TTGTGCTTTTTGTGCTTTTTGTGCT	-3'
3006G	5'- TTGTCGTTTTGTCGTTTTGGGGG	-3'

Tabelle I: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (A= Adenin, C= Cytosin, G= Guanin, T= Thymin)

Alle ODN wurden in Phosphorothioat modifizierter Form verwendet.

2.1.12 Herstellung verdauter *Escherichia coli* DNA

Escherichia coli DNA wurde in Aqua_{bidest} gelöst, mit DNaseI (1000 U/mg DNA) und mit 1/5 des Volumens 5 x DNaseI Puffer versetzt. Die DNA wurde über Nacht bei 37°C verdaut und die DNaseI nach der Inkubation bei 65°C für 30 min inaktiviert. Der Verdau wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Die DNaseI wurde von Boehringer (Mannheim, Deutschland) bezogen.

2.1.13 Zytokine

Die Zytokine Interleukin 3 (IL3), Interleukin 4 (IL4), Interleukin 12 (IL12) und Granulozyten/Monozyten- Kolonie formierender Faktor (GM-CSF) sind Produkte von Pharmingen (San Diego, CA), Interferon Typ I (IFN I) von PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, NJ).

2.1.14 Zytokine blockierende Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die Blockierung von Zytokinen und ihrer Wirkung in Kulturen verwendet:

anti human IL12 (p40/p70)	Maus IgG1	2 µg/ml	Pharmingen, San Diego, CA
anti human IL4	Ratte IgG1	200 ng/ml	Pharmingen, San Diego, CA
Hase anti human IFN α	polyklonales Serum	1000 nU/ml	PBL, New Brunswick, NJ
Hase anti human IFN β	polyklonales Serum	1000 nU/ml	PBL, New Brunswick, NJ

2.2 Isolation von primären Immunzellen und Zelllinien

2.2.1 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Peripherblut mononukleäre Zellen (PBMZ) wurden nach einer Anleitung gemäß den „current protocols in immunology“ mit leichten Änderungen isoliert. Blutzellsuspensionen von Eigenblutspenden wurden mit Medium ohne FKS im Verhältnis 1:1 verdünnt, mit Ficoll-Hypaque Lösung unterschichtet und bei 1000 g, Raumtemperatur ohne Bremse für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert und anschließend die festen Partikel bei 2000 g abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde nach Bedarf als 50%iges Serum für Kulturmedien verwendet. Die Interphase über der Ficoll-Hypaque Lösung wurde vorsichtig abgenommen und dreimal mit HBSS gewaschen. Die Zellen wurden in Ammoniumchlorid Lösung resuspendiert, 5 min bei 37°C inkubiert, erneut mit HBSS gewaschen und in Medium aufgenommen. Die resultierende Zellsuspension wurde am Fluoreszenz aktivierten Zellsorter (FACS) Epics XL (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) aufgrund des Vorwärtsscatters auf den Gehalt an Blutplättchen überprüft und

gegebenenfalls nochmals gewaschen. Anschließend wurde die Konzentration mittels Auszählen einer Eosinfärbung in der Neubauerkammer bestimmt.

2.2.2 Isolation von T-Lymphozyten aus PBMZ

Für die Aufreinigung von T-Lymphozyten aus PBMZ wurde ein Selektionskit der Firma Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden durch eine komplexe Mischung von Antikörpern, die ein Hapten tragen, alle nicht T-Zellen markiert. Nach einem Waschschrift werden diese Antikörper mit Konjugaten aus anti-Hapten Antikörpern und paramagnetischen Kügelchen gegengefärbt. Danach wurde die Zellsuspension erneut gewaschen und die markierten Zellen durch Aufbringen auf eine Säule in einem Magnetfeld selektioniert. Der prozentuale Anteil von T-Lymphozyten in der Negativfraktion wurde durch FACS-Färbung überprüft und lag über 95%.

2.2.3 Isolation von Monozyten aus PBMZ

Die Isolation von Monozyten basierte auf der hohen Adhärenz der Zellen an Plastik. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 12×10^6 /well in 12-well-Platten in Medium mit 10% FKS für 2 Stunden in einem Brutschrank inkubiert. Durch Rotieren der Platten wurden die nicht adhärenen Zellen abgelöst und mit dem Überstand abgesaugt. Die am Plastik haftenden Zellen wurden nochmals mit Medium gewaschen und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Nachdem die Zellen nochmals gewaschen wurden, wurden sie mit einem Zellschaber abgekratzt und erneut in frischen Platten mit einer Dichte von 5×10^6 /well für 1 Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen gesammelt, mittels Eosinfärbung gezählt und durch FACS-Färbung auf Reinheit überprüft. Die resultierenden Zellsuspensionen bestanden aus mindestens 90% Monozyten.

2.2.4 Isolation von Monozyten oder B-Lymphozyten depletierten PBMZ

Für die Depletion von Monozyten oder B-Lymphozyten aus PBMZ wurden Selektionskits der Firma Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dabei werden Monozyten aufgrund ihrer CD14 Expression und B-Zellen auf der Basis von CD19 selektioniert. Der prozentuale Anteil von Monozyten bzw. B-Zellen in der Negativfraktion wurde durch FACS-Färbung überprüft und lag unter 1%.

2.2.5 Isolation von CD11c- lymphoiden DZ depletierten PBMZ

PBMZ wurden mit einem PE markierten monoklonalen Antikörper gegen CD123 für 30 min bei 4°C gefärbt. Die Suspension wurde mit HBSS gewaschen und mit anti PE-Magnetpartikel- Konjugaten gegengefärbt. So markierte Zellen wurden im Magnetfeld von den restlichen Zellen getrennt. Die nicht auf der Säule zurückgehaltene Fraktion wurde mittels FACS-Analyse auf CD123+ HLA-DR+ Zellen untersucht. Die Frequenz dieser lag unter 0,001 %.

2.2.6 Isolation von B-Lymphozyten aus Tonsillen

Für die Isolation von B-Lymphozyten wurden Tonsillen als Quelle gewählt, da der Anteil in lymphoiden Organen höher liegt als in Blut. Kleine Gewebestücke wurden mittels eines Stempels durch ein Maschennetz gedrückt und diese Einzelzellsuspension über ein 70 µm Sieb von festen Bestandteilen und verklumpten Zellen gereinigt. Für die weitere Aufreinigung von B-Lymphozyten wurde ein negativ Selektionskit der Firma Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der prozentuale Anteil von B-Lymphozyten in der Negativfraktion wurde durch FACS-Färbung überprüft und lag über 95%.

2.2.7 Isolation von CD11c- lymphoiden dendritischen Zellen aus Tonsillen

CD11c- lymphoide dendritische Zellen wurden aus Tonsillen aufgereinigt durch die Kombination von MACS Separation oder Elutriation und FACS-Sortierung. Frische Tonsillen wurden in kleine Stücke geschnitten und durch ein Maschensieb gedrückt. Die so erzielte Einzelzellsuspension wurde zweimal mit HBSS gewaschen. Für die Elutriation wurden 1×10^9 Zellen in 10 ml HBSS resuspendiert und in einem Elutriationsrotor (JE-6B mit Sandersonkammer, Beckman, München, Deutschland) bei konstanter Rotationsgeschwindigkeit (1800 U/min) mit steigender Gegenflußrate (8 bis 24 ml/min) der Größe nach aufgetrennt. Fraktionen mit einer hohen Frequenz an CD123+ Zellen wurden vereinigt und mit HBSS gewaschen. Für die MACS Separation wurden die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD123 für 30 min bei 4°C gefärbt, der mit dem Fluorochrom PE markiert ist. Die Suspension wurde mit HBSS gewaschen und mit Konjugaten aus anti PE- Antikörpern und paramagnetischen Partikeln gegengefärbt. So markierte Zellen wurden im Magnetfeld positiv angereichert. Die Zellen wurden erneut mit HBSS gewaschen. Vor der Weiterverarbeitung der Zellen aus beiden Voranreinigungsschritten wurden diese über ein 70 µm Sieb (Falcon, Heidelberg, Deutschland) von Zellklumpen und Festbestandteilen getrennt. Die entgültige Reinigung erfolgte mittels Fluoreszenz aktivierter Zellsortierung (FACStar plus, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) auf der Basis von CD123. Die so gewonnene Population war über 98% rein. Alle Reinigungsschritte wurden in der Gegenwart von 100 µg/ml DNaseI (Boehringer, Mannheim, Deutschland) durchgeführt, um das Verklumpen der Zellen zu minimieren.

2.2.8 Generierung myeloider dendritischer Zellen aus Blutmonozyten

Myeloide DC wurden aus CD14⁺ Blutmonozyten durch die Kultivierung mit GM-CSF und IL4 gewonnen. Monozyten wurden durch positive Selektion auf der Basis von CD14 durch die MACS Separation aus PBMZ gewonnen. Die Reinheit der Monozyten wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt und betrug über 95 %. Sie wurden in einer Dichte von 1×10^6 /ml für 7 Tage in 800 U/ml GM- CSF und 500 U/ml IL4 differenziert. Um die Konzentration an Zytokinen aufrecht zu erhalten wurden jeden zweiten Tag 500 U/ml GM-CSF und 300 U/ml IL4 zugesetzt. An Tag 7 erhält man durch diese Prozedur immature myeloide DC, die durch Zugabe von LPS oder definierter Zytokine vollständig ausdifferenziert werden können.

2.2.9 Zelllinie

Die Fibroblastenzelllinie 3T3, die transgen für humanen CD40L ist, wurde von Dr. Thomas Decker (Institut für Hämatologie, Klinikum Rechts der Isar München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Für die Kultivierung wurde das Neomycinderivat Geneticinsulfat (G418) in einer Konzentration von 200 µg/ml zugesetzt (GIBCO, Eggenstein, Deutschland).

2.3 Zelluläre Arbeiten und Methoden

2.3.1 Messung von Proliferation

PBMZ (1×10^5 /well), B-Lymphozyten (5×10^4 /well) oder CD11c- lymphoide DC (20×10^3 /well) wurden in Vierfachbestimmungen bei 37°C in 96-well-U- Bodenplatten (Falcon, Heidelberg, Deutschland) unter Zugabe unterschiedlicher Stimulantien kultiviert. Wurden PBMZ verwendet, wurde autologes Serum anstatt FKS dem Medium zugesetzt. Falls in der Experimentführung nicht explizit genannt, wurden die Kulturen an Tag 4 mit $1 \mu\text{Ci}$ ($6,7 \text{ Ci/mM}$) [^3H]- Thymidin für 6 Stunden gepulst. Nach einem Gefrierschritt wurden die lysierten Zellen mit einem 96-well Zellharvester (Inotech, Schweiz) durch einen Glasfieberfilter gesaugt. Die [^3H]-Thymidininkorporation in die auf dem Filter zurückgehaltene DNA wurde in einem Matrix-96 Counter (Packard Instruments, Meriden, CT) vermessen. Von Vierfach-Kulturen wurden Mittelwert und Standardabweichung der gemessenen β -Strahler-Aktivität (Z.p.M. = Zerfälle pro Minute) ermittelt. Wurden 3T3 Zellen, die stabil mit CD40L transfiziert sind, als Stimuli eingesetzt, so wurden diese mit 4000 rad in einer Cäsiumquelle bestrahlt, um die weitere Zellteilung dieser zu unterbinden.

2.3.2 Bestimmung der Zytokinproduktion

PBMZ (5×10^6 /ml), Monozyten (1×10^6 /ml), myeloide DC (1×10^6 /ml) oder CD11c- lymphoide DC ($0,2 \times 10^6$ /ml) wurden bei 37°C in 24-well-Platten unter Zugabe unterschiedlicher Stimulantien inkubiert. Die Überstände der PBMZ-, Monozyten- und myeloider DC- Kulturen wurden für IL1 α , IL6, IL8, IL10, IL12p40, GM-CSF und IFN α nach 24 h oder für TNF nach 8 h gesammelt. Für CD11c- lymphoide DC wurden aus zeitlichen Gründen die Überstände für die Bestimmung von TNF nach 12 h und für die restlichen Zytokine nach 36 h gewonnen. Die Proben wurden in Doppelbestimmungen analysiert und

die ELISA nach den Gebrauchsanweisungen der Hersteller durchgeführt. Falls in den Reagenziensätzen nicht enthalten, wurden Streptavidin- Peroxidase- Konjugat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) als Enzym und O- Phenylendiamin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) als Substrat für die Farbreaktion verwendet. Die ELISA Reagenziensätze für TNF, IL1 α , IL6, IL10 und IL12 p40 wurden von Pharmingen (San Diego, CA), die für GM-CSF und IL8 von R&D Systems (Minneapolis, MN) und die für IFN α von PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, NJ) bezogen.

2.3.3 Messung der Oberflächenantigenexpression

PBMZ (5×10^6 /ml), Monozyten, B-Lymphozyten oder myeloide DC (1×10^6 /ml) wurden in 24-well-Platten über Nacht bei 37°C unter der Zugabe verschiedener Stimuli kultiviert. CD11c- lymphoide DC ($0,2 \times 10^6$ /ml) wurden für 36 h kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS + 2%FKS gewaschen und für die Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit humanem Immunglobulin G (IgG) (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Antikörper für spezifische Färbung waren entweder direkt mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder mit dem Fluorchrom Cy- Chrom, einem Tandemkonjugat aus Phycoerythrin und einem Zyaninfarbstoff, markiert oder mit Biotin konjugiert. Für die spezifische Färbung wurden Zellen mit entsprechenden Antikörpern für 30 min bei 4°C inkubiert und zweimal mit PBS + 2%FKS gewaschen. Biotin markierte Antikörper wurden daraufhin für 20 min mit Streptavidin- Fluorchrom- Konjugaten gegengefärbt und nochmals gewaschen. Die so behandelten Zellen wurden mit 1% Paraformaldehyd Lösung fixiert und an dem Fluoreszenz aktivierten Zellsortierer (FACS) EPICS XL (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) analysiert. Antikörper gegen folgende Oberflächenantigene wurden für die Färbungen verwendet:

Bezeichnung	Isotyp	Quelle
CD1a	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
CD3	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
CD4	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
CD8	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
CD11c	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
CD13	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
CD14	Maus IgG2a	Pharmingen, San Diego, CA
CD16	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
CD19	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
CD33	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
CD40	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
CD45RA	Maus IgG2b	Pharmingen, San Diego, CA
CD45R0	Maus IgG2a	Pharmingen, San Diego, CA
CD54	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
CD56	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
CD69	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
CD71	Maus IgG2a	Pharmingen, San Diego, CA
CD80	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
CD83	Maus IgG2b	Immunotech, Hamburg, Deutschland
CD86	Maus IgG2b	Pharmingen, San Diego, CA
CD116	Maus IgG2a	Pharmingen, San Diego, CA
CD123	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
HLA- A, B, C	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
HLA- DR	Maus IgG2a	Pharmingen, San Diego, CA
Isotypkontrolle IgG1	Maus IgG1	Pharmingen, San Diego, CA
Isotypkontrolle IgG2a	Maus IgG2a	Pharmingen, San Diego, CA
Isotypkontrolle IgG2b	Maus IgG2b	Pharmingen, San Diego, CA

Tabelle II: Auflistung der Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Antikörper wurden FITC- oder PE- konjugiert verwendet.

Stimulationsindex für die Expression von Antigenen, die mit Kostimulation und Präsentation verbunden sind, wurden nach folgender Gleichung errechnet:

[durchschnittliche Fluoreszenzintensität (stimuliert) - durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Isotypkontrolle)] : [durchschnittliche Fluoreszenzintensität (unstimuliert) - durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Isotypkontrolle)]

2.3.4 Bestimmung des Anteils lebender Zellen

CD11c- lymphoide DC ($20 \times 10^3/\text{ml}$) wurden in 96-well-U- Bodenplatten (Falcon, Heidelberg, Deutschland) unter Zugabe unterschiedlicher Stimulantien kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Propidiumiodid bei einer Endkonzentration von $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ für 10 min inkubiert. Die spezifische Färbung der in toten Zellen zugänglichen DNA wurde mittels FACS-Analyse untersucht und somit die Frequenz der lebenden Zellen bestimmt.

2.3.5 Zytologische Analysen

Zellen wurden auf Objektträger bei 300 g für 3 min zytozentrifugiert und nach anschließendem Trocknen 5 min mit Methanol fixiert. Die getrockneten Objektträger wurden für 20 min mit May-Giemsa Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt und mit Aqua_{bidest} gewaschen. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop LSM510 (Zeiss, Heidelberg, Deutschland) aufgenommen.

2.3.6 Stimulation von T-Zellen in PBMZ

PBMZ ($1 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 3 Tage mit 10 ng/ml eines monoklonalen Antikörpers gegen CD3 (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) inkubiert. Anstatt fötalem Kälberserum wurde autologes Serum für die Zubereitung des Mediums verwendet. Als Additiv wurde dem Medium weiterhin 1 mM Pyruvat zugesetzt. Zusätzlich zu dem TZR- Stimulus wurden gegebenenfalls blockierende Antikörper und Zytokine in folgenden Kombinationen verwendet: 10 ng/ml IL4 und 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αIL12 oder 2 ng/ml IL12 und 200 ng/ml αIL4 . Als weiterer Stimulus wurden 2 μM Oligonukleotid 2006 verwendet. Nach 3 Tagen wurden die Zellen mit Medium gewaschen und die T-Lymphozyten mit 10 U/ml IL2 vermehrt. Um eine konstante Konzentration an IL2 zu gewährleisten, wurde den Kulturen jeden zweiten Tag 10 U/ml IL2 zugesetzt. An Tag 7 wurden die Zellen erneut mit Medium gewaschen, gezählt und $0,1 \times 10^6/\text{well}$ auf αCD3 beschichteten 96well U-Boden Platten ausgesät. Nach 24 h wurden die Kulturüberstände abgenommen und mittels ELISA auf IL4 und $\text{IFN}\gamma$ analysiert. Die αCD3 beschichteten Platten wurden wie folgt hergestellt: Eine 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αCD3 Lösung wurde zu 50 μl pro well auf die Platte aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen und für 1 h mit PBS + 10%FCS geblockt. Die Platten wurden nochmals gewaschen und darauf mit den Ansätzen beschickt.

2.4 Statistische Auswertung

Bei manchen Untersuchungsmethoden wurden Mittelwerte aus mehreren Experimenten gewonnen. Die statistische Auswertung auf signifikante Unterschiede verschiedener Stimuli im Vergleich zu einer Kontrollgruppe erfolgte mittels "Student's T-Test".

3 ERGEBNISSE

3.1 Effekte auf B-Lymphozyten

Methoden, um die Responsivität von B-Zellen auf unterschiedliche Stimuli zu testen, bestehen in der Messung von Proliferation, der Hochregulation von Oberflächenmolekülen, sowie der Ausschüttung von Zytokinen.

3.1.1 CpG-DNA induzierte Proliferation von PBMZ

Proliferation ist eine Voraussetzung für die Amplifikation von Immunantworten und kann über den Einbau von [³H]-Thymidin in die DNA sich vermehrender Zellen bestimmt werden. In humanen PBMZ haben B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK Zellen) die Potenz zur intensiven Zellteilung.

Die Behandlung humaner PBMZ mit *Escherichia coli* DNA (EC DNA) führt zu einer Dosis abhängigen Proliferation, während Kalbsthymus DNA (KT DNA) als Prototyp eukaryotischer DNA keine mitogene Wirkung zeigt (Abb. 2A). Der proliferative Effekt kann durch die Behandlung mit DNaseI zerstört werden, ist aber nicht sensitiv gegenüber der Blockierung durch den LPS-Kompetitor 406 (Abb. 2B).

Aufgrund des Befundes, daß prokaryotische DNA in PBMZ zur Zellteilung führt, wurden die Oligonukleotide 2006, DSP30 und 1668, sowie ihre entsprechenden Kontrollen 2006K, DSP30K und 1668K auf ihre Mitogenität getestet. Bei den Kontrollen handelt es sich um Oligonukleotide, bei denen enthaltene CpG invertiert bzw. transvertiert wurden, so daß die Motive zumindest partiell zerstört werden, aber Charakteristika wie Ladung, Masse u.ä. konstant bleiben. Für alle CpG-Oligonukleotide liegt das Maximum bei 2 µM (Abb. 3), während die Stimulation durch die Kontrollen um das zwei- bis vierfache geringer ausfällt. Dennoch zeigen alle GpC-Oligonukleotide gegenüber dem Sequenz nicht verwandten Oligonukleotid AP1 residuale Aktivität.

Abbildung 2

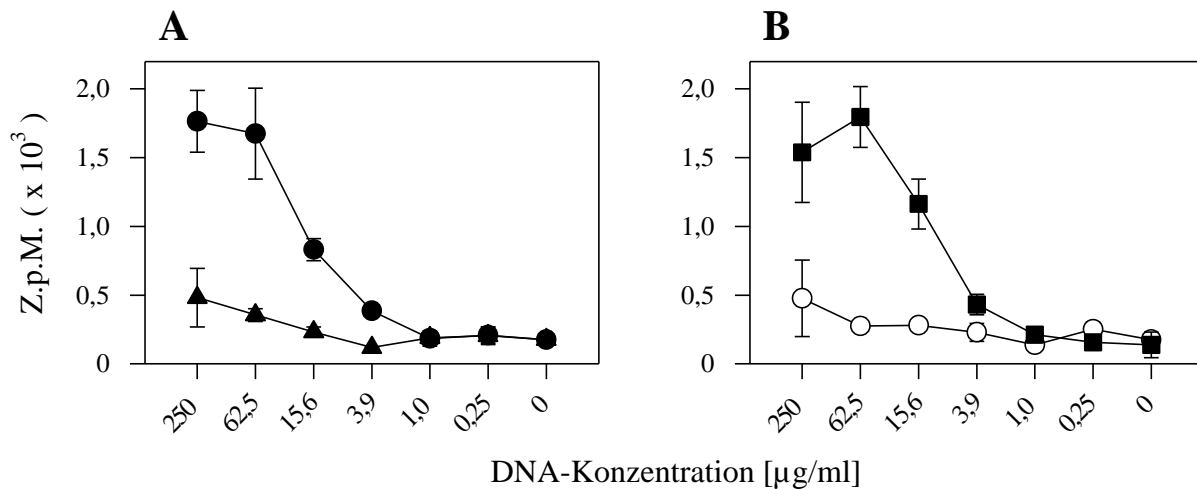


Abbildung 2: Proliferation humaner PBMZ induziert durch EC DNA

PBMZ (1×10^5 /well) wurden in 96well-Rundbodenplatten für 4 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen von DNA kultiviert. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

(A) \blacktriangle repräsentiert Kulturen mit EC DNA und \bullet Kulturen mit KT DNA.

(B) \bullet stellen Kulturen mit EC DNA dar, denen der LPS-Kompetitor 406 ($1 \mu\text{g/ml}$) zugesetzt wurde und \circ Kulturen mit DNaseI verdauter EC DNA.

Kulturen, die mit TPA (10 nM) und Ionomycin ($1 \mu\text{M}$) stimuliert wurden, inkorporierten durchschnittlich 56221 Z.p.M..

3.1.2 CpG-spezifische Proliferation von B-Lymphozyten

Zur Identifizierung der proliferierenden Population wurde die Expression von CD71 auf den in PBMZ vorkommenden Zelltypen mittels FACS-Analyse bestimmt. Das Hochregulieren von CD71, dem Transferrin-Rezeptor, stellt einen mit Zellteilung korrelierenden Vorgang dar. Während weder T-Lymphozyten, noch NK-Zellen nach Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden CD71 exprimieren (Daten nicht dargestellt), zeigt sich eine Erhöhung der Durchschnittsfluoreszenz um das vierfache auf B-Lymphozyten, die über die Expression von CD19 identifiziert werden können (Abb. 4). Die Hochregulation findet sich auf über 90% der B-Zellen, was darauf hinweist, daß CpG-ODN einen polyklonalen Stimulus für diese Zellen darstellen (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnte auch in der CD19 negativen Population keine Expression von CD71 festgestellt werden. B-Lymphozyten sind somit die einzige

Zellpopulation, die in PBMZ auf CpG-DNA mit Proliferation (Einbau von [³H]-Thymidin und Expression von CD71) reagieren. Diese Hochregulation von CD71 ist ebenso wie die vorher erwähnte Zellproliferation von der Anwesenheit von CpG-Motiven in den ODN abhängig.

Abbildung 3

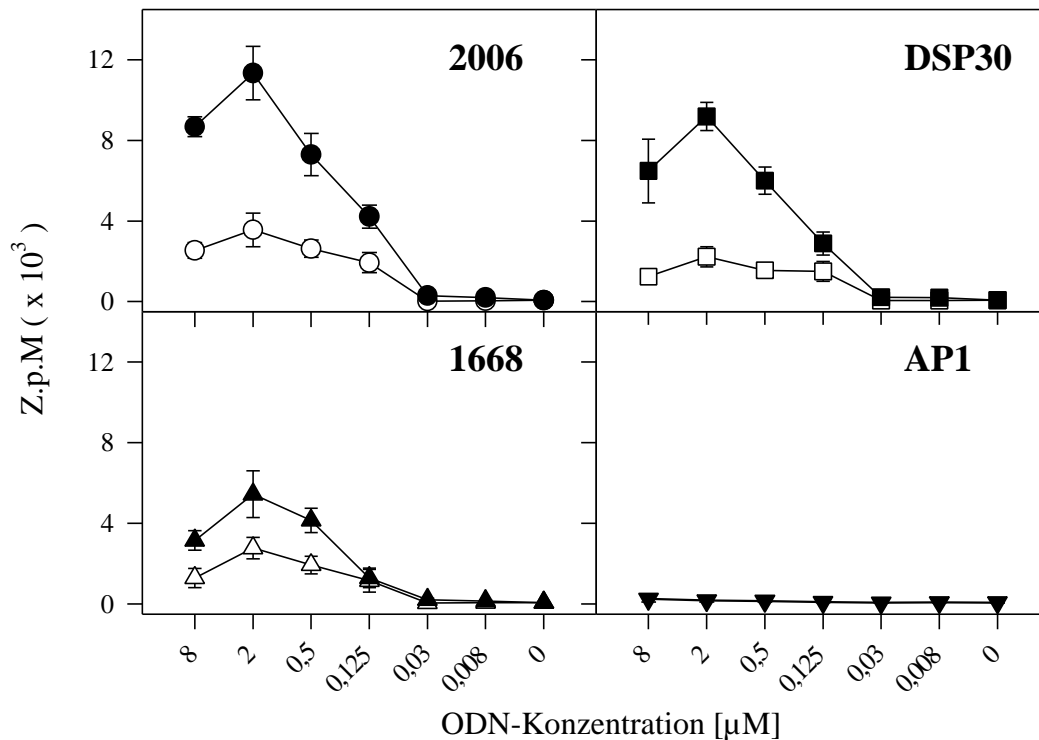


Abbildung 3: Proliferation humaner PBMZ induziert durch CpG-ODN

PBMZ (1×10^5 /well) wurden in 96well-Rundbodenplatten für 4 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen von CpG-ODN und Kontrolloligonukleotiden kultiviert. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die ausgefüllten Symbole repräsentieren Kulturen, die mit den CpG-ODN 2006 (●), DSP30 (◐), 1668 (◑) oder dem Sequenz nicht verwandten Oligonukleotid AP1 (●) stimuliert wurden, und die offenen repräsentieren Kulturen mit den entsprechenden GpC-Kontrolloligonukleotiden 2006K (○), DSP30 (□) und 1668K (△).

Um zu zeigen, daß es sich bei der Mitogenität der CpG-DNA um einen direkten Effekt auf B-Zellen handelt, wurden B-Zellen mittels der MACS-Technologie aus Tonsillen gereinigt und analog der PBMZ stimuliert. *Escherichia coli* DNA regt reine B-Zellen dosisabhängig zur Zellteilung an und zeigt eine ähnliche Titrationskurve wie bei PBMZ. DNaseI verdaute EC DNA und Vertebraten-DNA zeigen keine proliferative Aktivität (Abb. 5A).

Abbildung 4

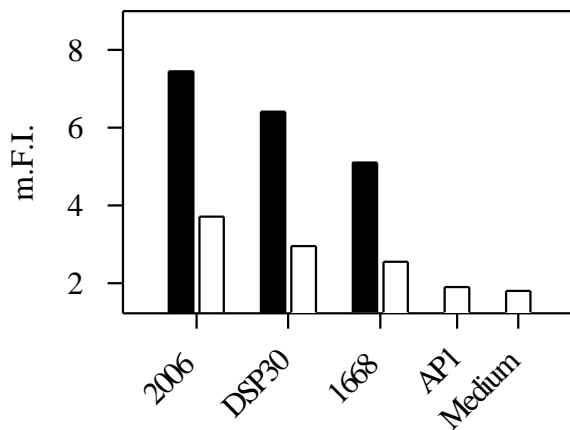


Abbildung 4: Expression von CD71 auf B-Lymphozyten durch CpG-ODN

PBMZ ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit $2 \mu\text{M}$ ODN inkubiert und nach 72 h mit $\alpha\text{CD19-PE}$ und $\alpha\text{CD71-FITC}$ gefärbt. Die mittlere Fluoreszenzintensität des Fluorochroms FITC in der CD19 positiven Population wurde bestimmt. Die schwarzen Balken symbolisieren Kulturen mit den CpG-ODN 2006, DSP30 oder 1668, die weißen Balken Kulturen mit den entsprechenden GpC-ODN 2006K, DSP30K, 1668K oder dem Sequenz nicht verwandten Kontrolloligonukleotid AP1. Medium stellt die mittlere Fluoreszenzintensität von FITC der CD19 positiven Population ohne Stimulation dar. Die Isotypkontrolle zeigte einen Wert von 1,22.

Abbildung 5

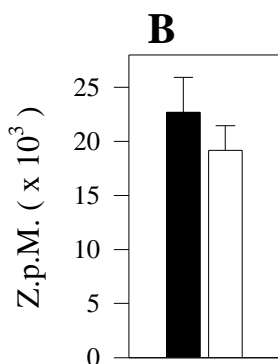
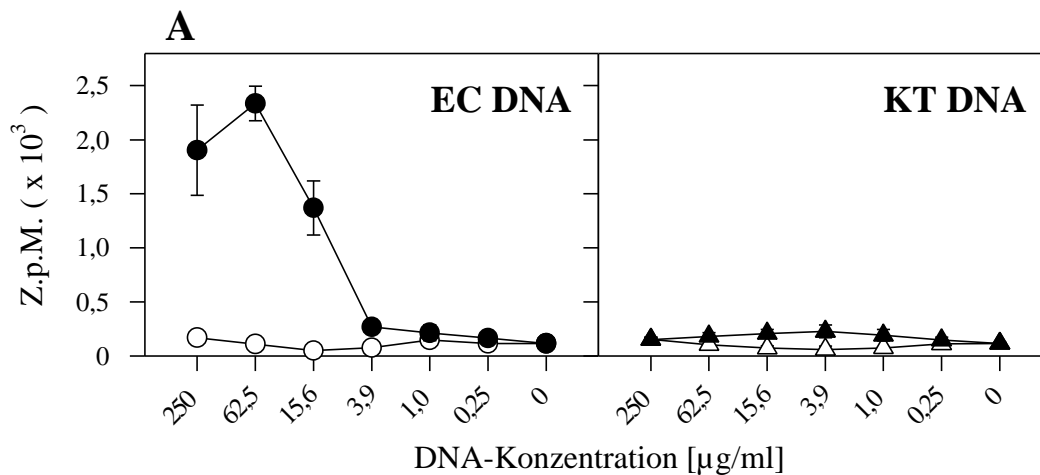


Abbildung 5: EC DNA induzierte Proliferation reiner B-Lymphozyten
Negativ selektionierte B-Lymphozyten ($50 \times 10^3/\text{ml}$) wurden in 96-well Rundbodenplatten für 4 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen von DNA kultiviert. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

(A) Die schwarzen Symbole stellen Kulturen dar, die mit EC DNA (⊙) oder KT DNA (⊗) stimuliert wurden, die weißen Symbole Kulturen mit DNaseI verdauter EC DNA (○) oder DNaseI verdauter KT DNA (△).
(B) Kulturen, die mit TPA (10 nM) und Ionomycin ($1 \mu\text{M}$) stimuliert wurden, werden durch den schwarzen Balken symbolisiert. Der weiße Balken steht für die zusätzliche Gabe von $50 \mu\text{g/ml}$ DNaseI verdauter EC DNA.

Durch den Verdau der DNA freigesetzte Nukleotide inhibieren nicht die allgemeine Responsivität der Zellen, da der Zusatz von verdauter EC DNA die TPA plus Ionomycin induzierte Proliferation nicht verringert (Abb. 5B). Die Kombination von TPA und Ionomycin stellt einen universellen Stimulus für Zellen des Immunsystems dar.

Wie bei PBMZ zeigt das Oligonukleotid 2006 die stärkste Proliferation induzierende Aktivität. Durch die Zerstörung des CpG-Motivs verringert sich der [³H]-Thymidineinbau um das 3,5- bis 6-fache, während die Behandlung mit dem Kontrolloligonukleotid AP1 keine Proliferation zeigt (Abb. 6). Weiterhin findet man weder in reinen T-Lymphozyten noch in B-Zell depletierten PBMZ Oligonukleotid induzierte Proliferation (Daten nicht dargestellt).

Abbildung 6

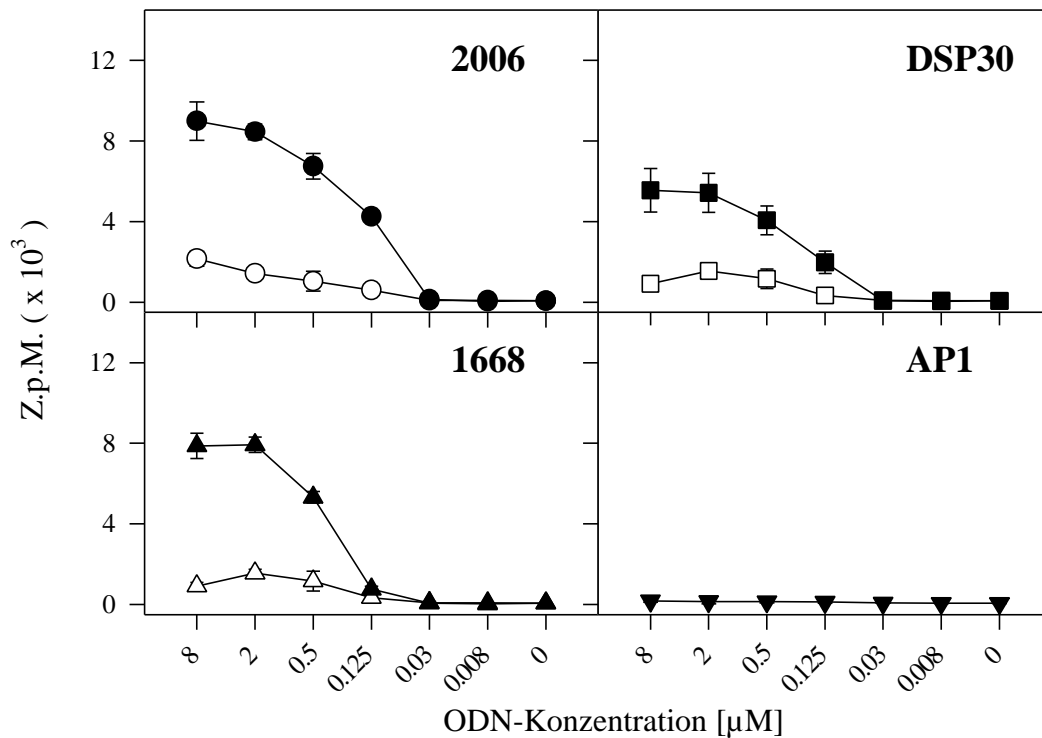


Abbildung 6: CpG-ODN induzierte Proliferation reiner B-Lymphozyten

Aus Tonsillen gereinigte B-Lymphozyten (50×10^3 /well) wurden in 96-well Rundbodenplatten für 4 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen von CpG-ODN und Kontrolloligonukleotiden kultiviert. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die schwarzen Symbole repräsentieren Kulturen, die mit den CpG-ODN 2006 (●), DSP30 (■), 1668 (▲) oder dem Sequenz nicht verwandten Oligonukleotid AP1 (▼) stimuliert wurden, und die weißen Symbole repräsentieren Kulturen mit den entsprechenden GpC-Kontrolloligonukleotiden 2006K (○), DSP30 (□) und 1668K (△). Ansätze ohne Stimulus inkorporierten durchschnittlich 63 Z.p.M..

3.1.3 Expression von kostimulatorischen und Antigen präsentiierenden Oberflächenmolekülen

Neben der Produktion von Antikörpern fungieren B-Lymphozyten als sogenannte Antigen präsentiende Zellen (APZ), da sie in der Lage sind, aufgenommene Antigene über MHC Klasse I und II zu präsentieren sowie Kostimulation bereitzustellen (Evans et al, 2000).

Stimulation von reinen B-Lymphozyten mit CpG-Oligonukleotiden führt zu einer bis 2,75-fachen Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD40. MHC Klasse I und II (HLA-ABC und HLA-DR) werden im unstimulierten Zustand auf B-Lymphozyten schon hoch exprimiert, zeigen aber dennoch leicht erhöhte Expression nach Oligonukleotidzugabe. Wie schon bei der Proliferation zu beobachten war, induzieren auch die Kontroll-oligonukleotide eine Hochregulation dieser Marker, wenn auch in geringerem Maße (Tab. III).

Tabelle III

Stimulation	Stimulationsindex			
	CD86	CD40	HLA-DR	HLA-ABC
2006	2,75	2,00	1,22	1,45
2006K	1,60	1,29	1,14	1,25
DSP30	2,00	1,53	1,16	1,26
DSP30K	1,71	1,38	0,97	1,05
1668	1,88	1,53	1,20	1,25
1668K	1,48	1,28	1,09	1,20

Tabelle III: Effekte von Oligonukleotiden auf die Expression von Oberflächenantigenen auf reinen B-Lymphozyten

B-Lymphozyten (1×10^6 /ml) wurden in 24well-Platten für 24 h nur mit Medium oder 0,2 μ M Oligonukleotiden inkubiert. Die Zellen wurden mit FITC- oder PE-gekoppelten Antikörpern gegen CD86, CD40, HLA-DR, HLA-ABC und mit den korrespondierenden Isotypkontrollen gefärbt. Die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten wurden mittels FACS Analyse bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Stimulationsindices wurden wie unter Material und Methoden angegeben errechnet.

3.1.4 Effekte von Chloroquin auf die Aktivierung von B-Zellen

Wie bereits an Mauszellen gezeigt ist für die Wirkung der Oligonukleotide die Aufnahme und die Reifung der Endosomen eine Grundvoraussetzung. Der Prozess der Reifung kann durch schwache diprotische Basen wie Chloroquin inhibiert werden, die die Ausbildung eines pH-Gradienten unterbinden (Hacker et al, 1998; Yi et al, 1998b).

Während Monozyten kleine Moleküle und größere Partikel sehr effizient aufnehmen können, findet man über die Aufnahme durch B-Zellen nur wenig Literaturangaben. Chloroquin wirkt jedoch gerade über die Inhibition von Ereignissen, die der Aufnahme in die Zelle folgen. Somit stellt sich die Frage, ob auch die Stimulation von B-Lymphozyten durch Chloroquin verhindert werden kann.

Abbildung 7

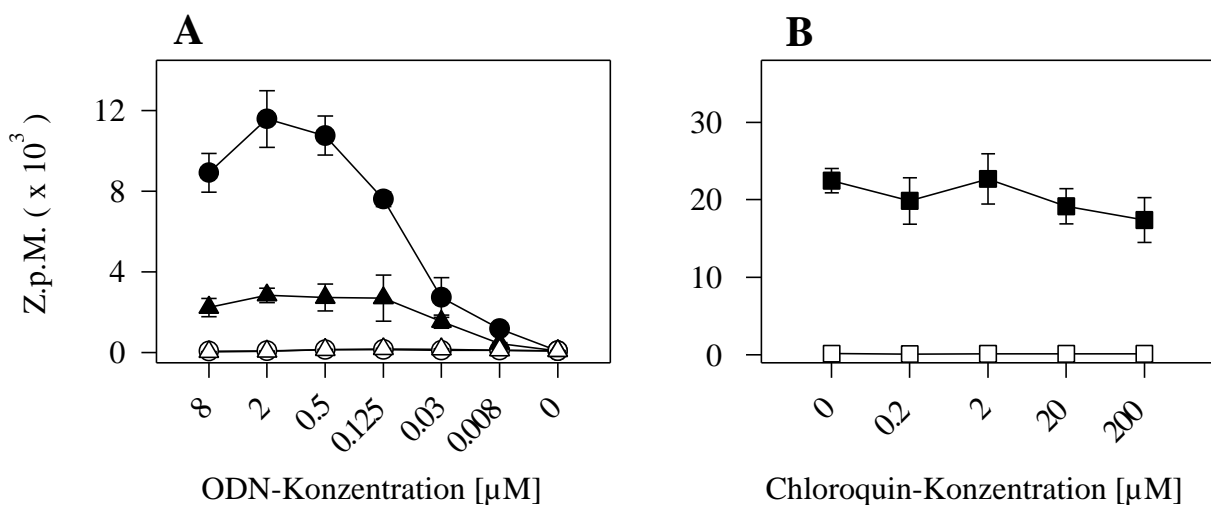


Abbildung 7: Effekte von Chloroquin auf die ODN induzierte Proliferation der B-Lymphozyten

(A) Aus Tonsillen gereinigte B-Lymphozyten (50×10^3 /well) wurden in 96-well Rundbodenplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen der ODN 2006 (⊙) oder 2006K (▲) stimuliert. Die entsprechenden weißen Symbole representieren Kulturen mit dem Zusatz von $2 \mu\text{M}$ Chloroquin.

(B) Die B-Lymphozyten wurden nur in Medium (□) oder mit 10 nM TPA und $1 \mu\text{M}$ Ionomycin (⊙) kultiviert und unterschiedliche Mengen an Chloroquin eintitriert.

An Tag 4 wurden die Kulturen mit $[^3\text{H}]$ -Thymidin versetzt und nach 6 h die Inkorporation in die DNA gemessen. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, ist die Oligonukleotid induzierte Proliferation vollständig durch den Zusatz von Chloroquin zu den Kulturen hemmbar, während die Aktivität von TPA plus Ionomycin auch im 100-fachen Überschuß von Chloroquin nicht inhibiert wird. Interessanter Weise wird auch die residuale Stimulation durch GpC-Oligonukleotide ebenso unterdrückt.

Ebenso ist Chloroquin in der Lage die Hochregulation der Oberflächenantigene zu unterdrücken (Daten nicht gezeigt).

3.2 Effekte auf Monozyten

Monozyten des Blutes und die aus ihnen entstehenden Makrophagen nehmen eine zentrale Rolle im Immunsystem ein. Sie sind in der Lage in der frühen Phase der Immunantwort lösliche Mediatoren zu produzieren. Diese Botenstoffe der nichtadaptiven Immunantwort zeigen sowohl lokale, als auch systemische Wirkungen.

Neben der Freisetzung löslicher Zytokine sind sie in der Lage über verschiedene Mechanismen Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und im Kontext mit MHC Klasse I und II zu präsentieren. Das Erkennen dieser MHC-Antigen-Komplexe mittels des T-Zell-Rezeptors reicht allerdings nicht für die Aktivierung der T-Zellen aus. Sie benötigen ein zweites Signal durch sogenannte kostimulatorische Oberflächenmoleküle wie CD80 und CD86.

Ein weiteres wichtiges Molekül ist CD40, das von Antigen präsentierenden Zellen exprimiert wird und über die Interaktion mit seinem Liganden CD40L der T-Lymphozyten die Antigen präsentierenden Zellen stimuliert.

3.2.1 Zytokinproduktion durch PBMZ

Die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen ist in der frühen Phase einer Immunantwort von eminenter Bedeutung für die angeborene Immunität. Interleukin 6 (IL6), Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Interleukin 12 (IL12) führen zu einer lokalen Entzündungsreaktion und zeigen als endogene Pyrogene oder durch die Freisetzung von akute Phase-Proteinen auch systemische Wirkungen (Akira et al, 1996). Durch seine Effekte auf die Differenzierung von naiven T-Lymphozyten zu Effektorzellen stellt IL12 ein wichtiges Verbindungsglied zwischen innater und spezifischer Immunität dar (Macatonia et al 1995).

PBMZ stimuliert durch *Escherichia coli* DNA produzieren IL6, IL12 und TNF, während der Zusatz von Kalbsthymus DNA nur geringe Mengen an Zytokinen freisetzt. Das Maximum der Zytokinproduktion liegt zwischen 62,5 und 3,9 µg/ml EC DNA (Abb. 8).

Abbildung 8

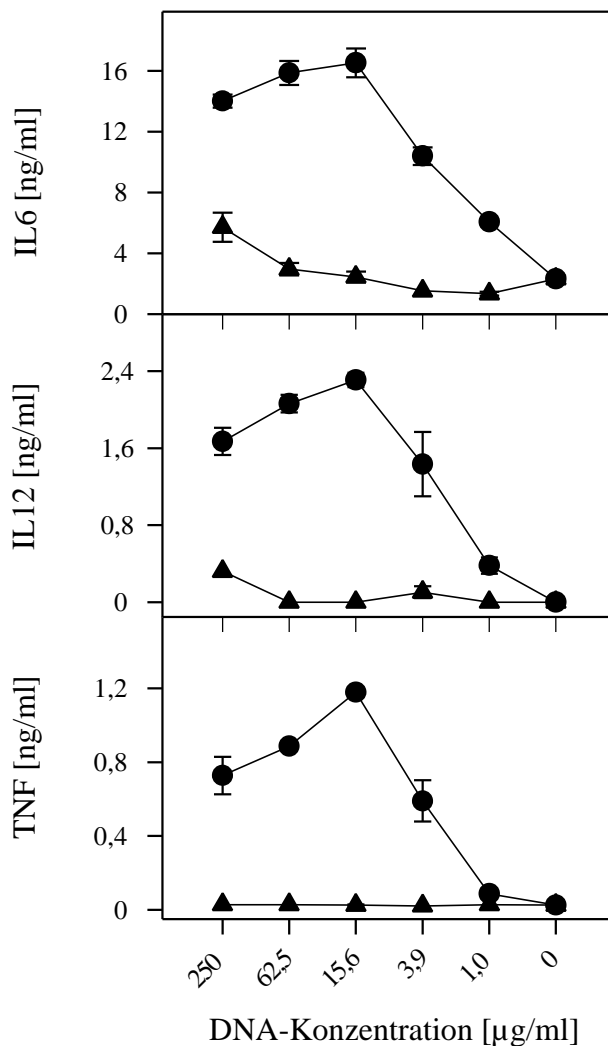


Abbildung 8: EC DNA induzierte Zytokinfreisetzung durch PBMZ

PBMZ (5×10^6 /ml) wurden mit unterschiedlichen Mengen an EC DNA (⊙) und KT DNA (⊗) in 24well-Platten stimuliert. Nach 8 h für TNF bzw. 24 h für IL6 und IL12 wurden die Konzentrationen an Zytokinen in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

LPS aus der Zellwand gram-negativer Bakterien ist ein äußerst potenter Stimulator für die Zytokinausschüttung aus Monozyten. Deshalb ist bei der Präparation bakterieller Produkte wie bakterielle DNA die Kontrolle möglicher Kontamination durch das Endotoxin nötig. Die Wirkung von LPS kann durch Zufügen des Analogons Compound 406 inhibiert werden (Abb. 9B). Compound 406 ist ein Kompetitor um die Bindung an den Rezeptor CD14 und besitzt keine Signaleigenschaften (Ulmer et al, 1992). Die Behandlung der DNA Präparation mit

diesem Kompetitor führte zu keiner Reduktion der Zytokinausschüttung, wie in Abb. 9A anhand von IL6 dargestellt, so daß ein von LPS als Kontamination vermittelter Effekt ausgeschlossen werden kann.

Abbildung 9

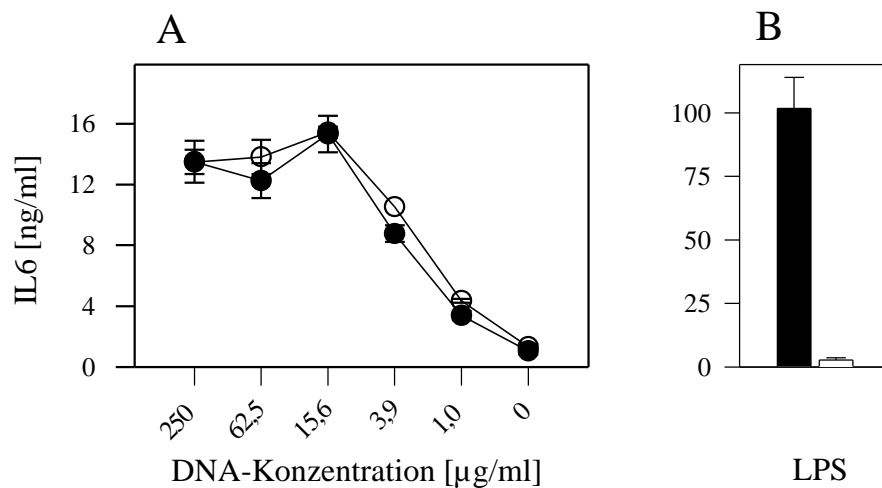


Abbildung 9: LPS-Kompetitor 406 blockt EC DNA induzierte IL6 Sekretion nicht
 PBMZ (5×10^6 /ml) wurden in 24well-Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen an EC DNA (A) oder 10 ng/ml LPS (B) stimuliert und nach 24 h wurden die IL6-Konzentrationen in den Kulturüberständen bestimmt. Die schwarzen Symbole bzw. Balken beschreiben die IL6-Produktion durch die Stimuli. Die weißen Symbole bzw. Balken zeigen die IL6-Werte unter der zusätzlichen Gabe von 1 µg/ml Kompetitor 406. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Wie von uns in unterschiedlichen Systemen mit Mauszellen gezeigt werden konnte, können Oligonukleotide, die das CpG-Motiv enthalten, als Modellsubstanzen für prokaryotische DNA angesehen werden. Aus diesem Grund wurden die CpG-Oligonukleotide 2006, DSP30 und 1668, sowie ihre entsprechenden Kontrollen 2006K, DSP30K und 1668K auf ihre Fähigkeit getestet, Zytokine in humanen PBMZ zu induzieren. Abbildung 10 ist zu entnehmen, daß alle CpG-Oligonukleotide IL6 aus PBMZ freisetzen und der effektive Bereich dabei zwischen 8 und 0,03 µM liegt. Maximale IL6-Ausschüttung findet man bei 2 µM, während bei Konzentrationen zwischen 2 und 20 µM die Freisetzung sinkt (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 10

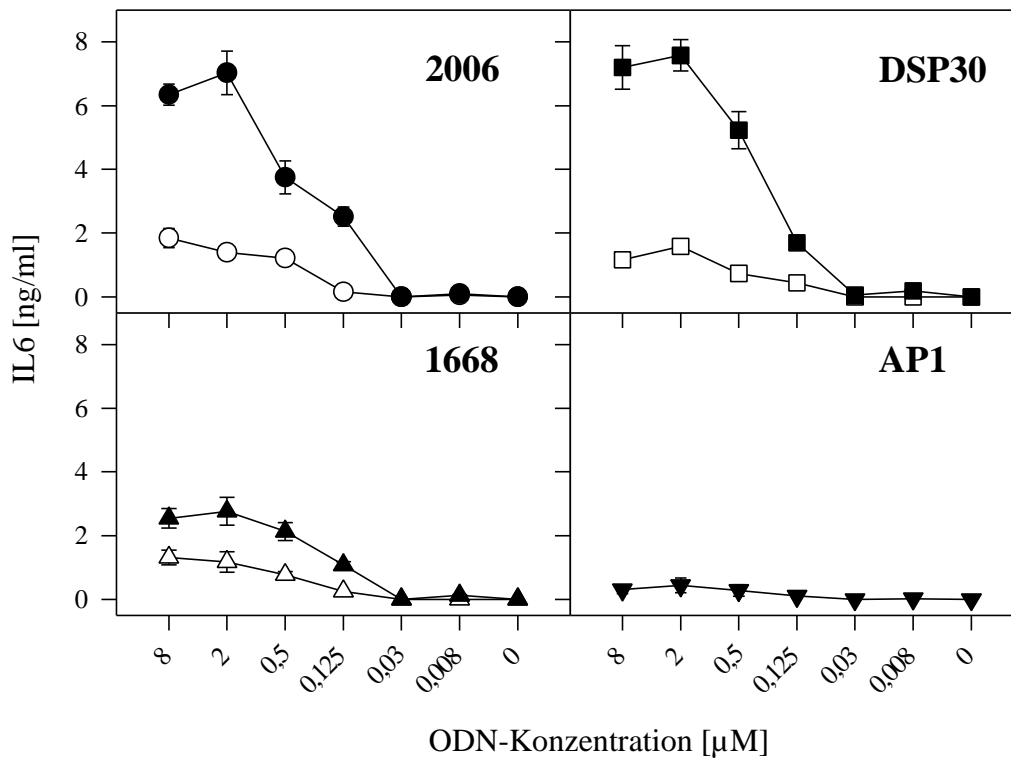


Abbildung 10: CpG-ODN induzierte IL6-Sekretion durch PBMZ
 PBMZ (5×10^6 /ml) wurden mit unterschiedlichen Mengen an Oligonukleotiden in 24well-Platten stimuliert. Nach 24 h wurden die Konzentrationen an IL6 in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die ausgefüllten Symbole repräsentieren Kulturen, die mit den CpG-ODN 2006 (●), DSP30 (■), 1668 (▲) oder dem Sequenz nicht verwandten Oligonukleotid AP1 (▼) stimuliert wurden, und die offenen repräsentieren Kulturen mit den entsprechenden GpC-Kontrolloligonukleotiden 2006K (○), DSP30 (□) und 1668K (△).

Die Oligonukleotide 2006 und DSP30 führen zu vergleichbarer Produktion von IL6, 1668 jedoch zeigt bei gleichem Titrationsverhalten eine 2,5-fach niedrigere Sekretion als 2006 und DSP30. Während die Kontrolloligonukleotide eine verminderte Ausschüttung von Zytokin bewirken, zeigt das Oligonukleotid AP1, das eine mit CpG-Motiven nicht verwandte Sequenz besitzt, so gut wie keine IL6-Produktion (Abb. 10).

Wie bereits für Interleukin 6 zeigte sich auch für IL12 eine CpG abhängige Produktion bei einer optimalen Oligonukleotidkonzentration von $2 \mu\text{M}$, dargestellt in Abbildung 11.

TNF konnte nach Stimulation mit CpG-ODN nicht konstant detektiert werden.

Abbildung 11

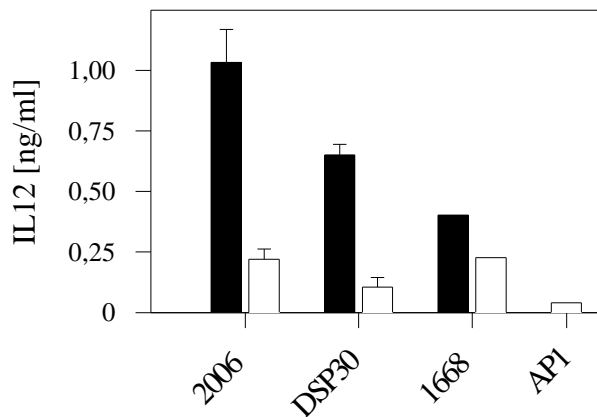


Abbildung 11: CpG-ODN induzierte IL12-Sekretion durch PBMZ

PBMZ (5×10^6 /ml) wurden mit $2 \mu\text{M}$ Oligonukleotid in 24well-Platten stimuliert. Nach 24 h wurden die Konzentrationen an IL12 in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die schwarzen Balken repräsentieren Kulturen mit den CpG-ODN 2006, DSP30 und 1668, die weißen Balken Kulturen mit den entsprechenden GpC-Kontrolloligonukleotiden 2006K, DSP30K und 1668K oder dem Sequenz unverwandten ODN AP1. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

3.2.2 CpG spezifische Zytokinsekretion durch Monozyten

Eine der Hauptquellen für die Zytokine IL6, IL12 und TNF sind Monozyten, die mit einer Frequenz von 10 bis 20% in PBMZ vertreten sind. Sie lassen sich durch ihre starke Adhärenz an Plastikkulturgefäße nahezu rein isolieren.

So gewonnene Monozyten zeigen bei Stimulation durch *Escherichia coli* DNA und CpG-Oligonukleotide ein ähnliches Verhalten wie PBMZ. EC DNA führte zu der Ausschüttung von IL6, IL12 und TNF. Das Maximum an Zytokinproduktion liegt bei $15,6 \mu\text{g/ml}$ EC DNA. KT DNA zeigt demgegenüber nur geringes stimulatorisches Potential (Abb. 12A).

Die CpG-Oligonukleotide 2006, DSP30 und 1668 sind in der Lage in reinen Monozyten die Produktion von IL6 und IL12 zu induzieren. ODN 1668, das potenteste CpG-Oligonukleotid bei Verwendung mit murinen Zellen, zeigt hierbei das geringste stimulatorische Potential. ODN 2006 ist der potenteste Zytokininduktor. Entsprechende Kontrolloligonukleotide sind schwach bis nicht aktivierend (Abb. 12B).

Die CpG-ODN wurden in einer Konzentration von 2 μ M verwendet. In Vorversuchen wurde diese Konzentration als optimal ermittelt. Mit Konzentrationen über 2 μ M sank die Produktion der untersuchten Zytokine. Bei Konzentrationen zwischen 2 und 0,03 μ M wurde eine konzentrationsabhängige Zytokinproduktion festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 12

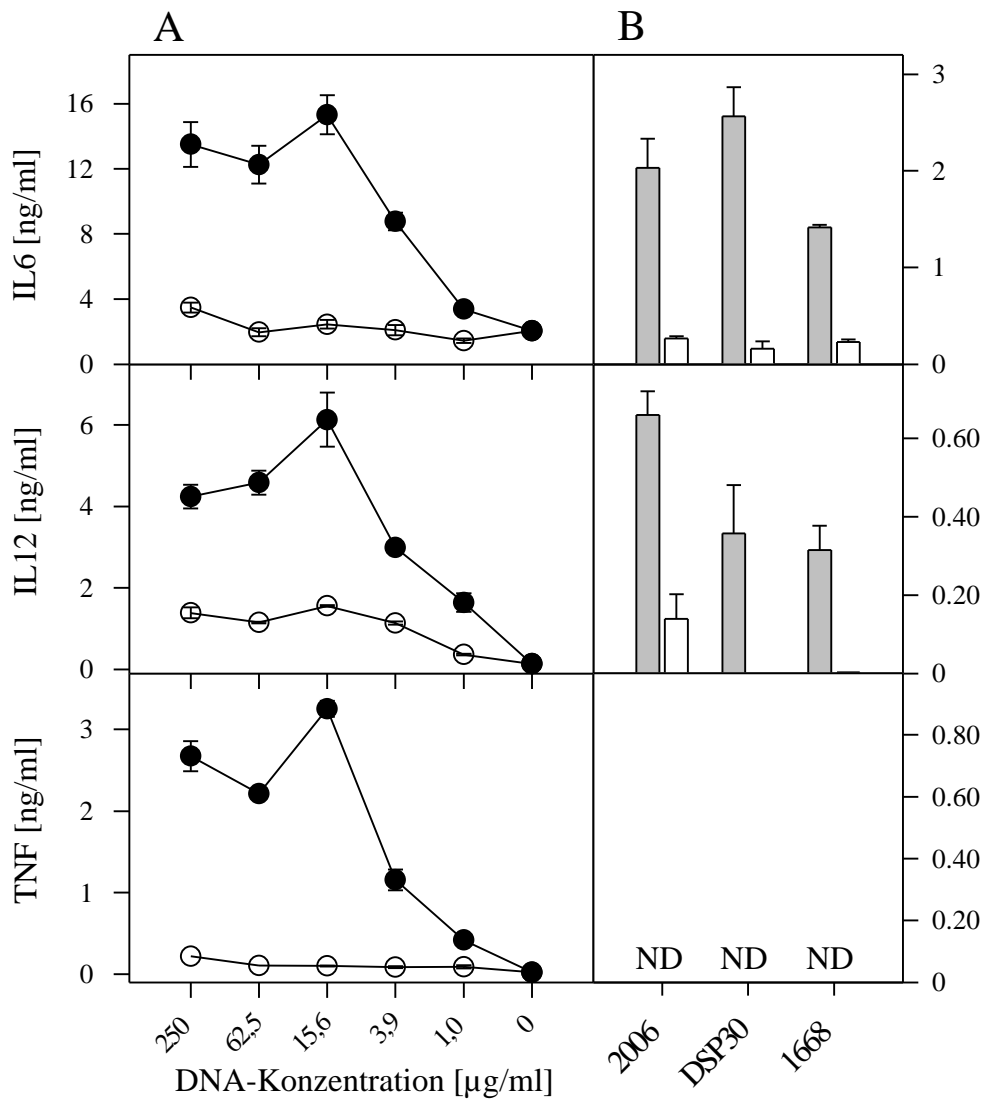


Abbildung 12: EC DNA und CpG-ODN stimulieren Monozyten zur Zytokinfreisetzung
 Monozyten (1×10^6 /ml) wurden mit EC DNA, KT DNA oder 2 μ M ODN stimuliert. Die Kulturüberstände wurden für TNF nach 8 h und für IL6 und IL12 nach 24 h gesammelt und mittels ELISA die Zytokinkonzentrationen bestimmt. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.
 Die schwarzen Symbole stehen für Stimulation mit EC DNA (●), die weißen für Stimulation mit KT DNA (○).
 (B) Die grauen Balken zeigen die Werte für Stimulation mit den CpG-ODN 2006, DSP30 und 1668, die weißen Balken mit den entsprechenden GpC-ODN 2006K, DSP30K und 1668K.

TNF wird, wie auch schon mit PBMZ gezeigt, nicht in jedem Versuch durch CpG-ODN freigesetzt (Abb. 12). Weshalb bei Verwendung von EC DNA TNF produziert wird, bei der Stimulation mit CpG-ODN jedoch TNF nicht konstant detektiert wird, konnte nicht beantwortet werden.

3.2.3 Priming durch IFN γ

Für die Stimulation von Monozyten ist bekannt, daß eine Vorinkubation mit Interferon γ (IFN γ) zu einer Vervielfachung der LPS induzierten IL12-Produktion führt. IFN γ alleine führt nur zu einer schwachen Zytokinfreisetzung sowie die gleichzeitige Gabe von IFN γ und LPS nur zu einer geringen Verstärkung gegenüber den Einzelstimulationen. Das Phänomen, daß die zeitlich getrennte Vorinkubation mit IFN γ die Effektivität von LPS zur IL12-Produktion steigert, wird als „IFN γ -Priming“ bezeichnet (Ma et al, 1996).

In Kinetikversuchen wurde die optimale Vorinkubationszeit mit IFN γ auf 16 Stunden festgelegt. Bei einer Primingphase von 16 h zeigte IFN γ ab einer Konzentration von 100 U/ml ein Plateau bezüglich der IL12-Produktion nach Stimulation mit LPS (Daten nicht dargestellt).

Vergleicht man die Sekretion von IL12 durch LPS, so erhält man mit IFN γ -Vorinkubation 4- bis 10-fach höhere Werte als durch LPS alleine (Abb. 13B). IFN γ führte nur zu einer geringen Freisetzung von 0,35 +/- 0,08 ng/ml IL12. Das Oligonukleotid 2006 führte zwar zu einer höheren IL12 Produktion nach IFN γ -Priming, jedoch liegt dieser Wert nicht signifikant über der Summe der separat durch die beiden Einzelstimuli induzierten Mengen (Abb. 13A).

Ein Primingeffekt durch IFN γ wie für LPS konnte für 2006 nicht festgestellt werden.

Abbildung 13

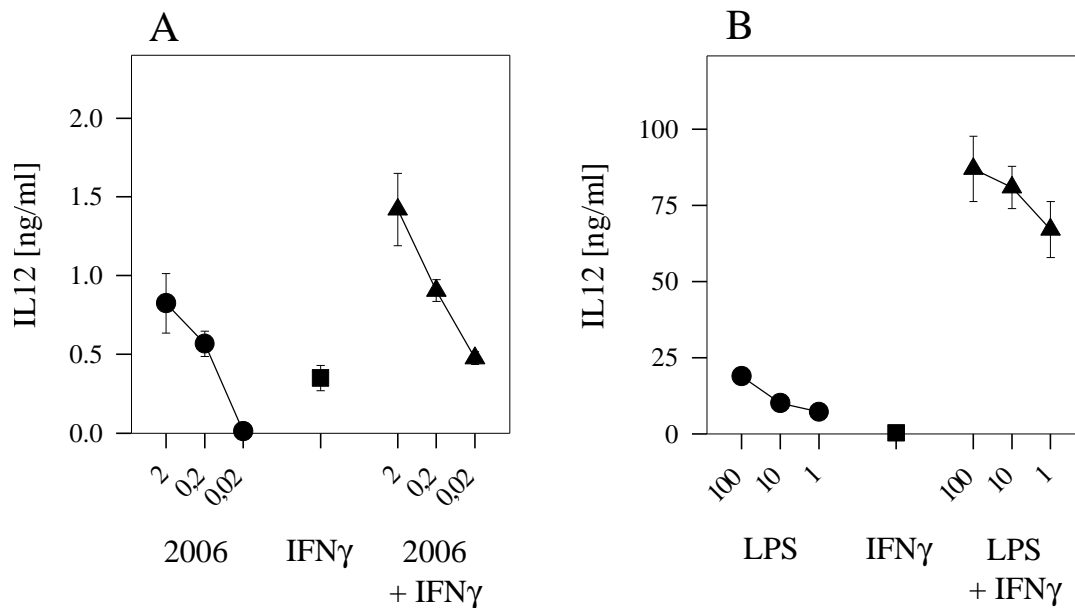


Abbildung 13: Einfluß des IFN γ -Priming auf die CpG-ODN induzierte IL12-Produktion

PBMZ (5×10^6 /ml) wurden in 24well-Platten für 40 h stimuliert, die Überstände abgenommen und die IL12-Konzentrationen durch ELISA bestimmt. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

(A) Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen [μ M] an CpG ODN 2006 (⊙) oder 100 U/ml IFN γ (⊙) inkubiert. Wurden beide Stimuli benutzt (⊗), wurden die Zellen für 16 h mit IFN γ vorinkubiert und für die letzten 24 h das ODN dazugegeben.

(B) Analog zu ODN in A wurden unterschiedliche Konzentrationen von LPS [ng/ml] verwendet.

3.2.4 Effekte G reicher Sequenzen

Durch Blockierungsstudien mit Chloroquin stellte man fest, daß die Aufnahme und die endosomale Maturierung essentiell für die Aktivität der Oligonukleotide ist. Die Internalisierung in die Zelle kann durch Inkubation mit Biotin markierten ODN und das intrazelluläre Gegenfärben mittels Streptavidin-Fluorochrom-Konjugaten im FACS quantifiziert werden.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Daten wurden leichte Veränderungen an der Sequenz von ODN 2006 vorgenommen. Das ODN wurde um ein Nukleotid verkürzt. Das C in Position 3 wurde durch ein T ersetzt sowie das CG in Position 21 zu GC invertiert. Das resultierende

Oligonukleotid 3006 enthält somit 2 repetitive CG Motive TTGTCGTT, da das am 3'-Ende liegende Motiv durch die Inversion des CG zu GC inaktiviert wurde. In Kinetikstudien zeigte sich für die Internalisierung kein Unterschied für ODN 3006 im Vergleich mit dem Kontrolloligonukleotid 3006K mit Inversionen der verbleibenden CG zu GC (Abb. 14).

Für Motive mit mehreren hintereinander liegenden G ist aus der Literatur bekannt, daß sie die Aufnahme von DNA unterstützen. In ODN 3006G wurden die Nukleotide in Position 20, 22 und 23 durch G ersetzt, so daß sich eine Sequenz von GGGGG ergibt. Durch das Anfügen dieses polyG-Motivs läßt sich die Aufnahme in Monozyten um das 3-fache steigern (Abb. 14). Daß es sich hierbei nicht nur um eine erhöhte Bindung an der Zelloberfläche handelt, konnte durch die spezifische Anfärbung der membrangebundenen Moleküle gezeigt werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach 8 h unpermeabilisiert gefärbt, so daß nur außen anhaftende ODN detektiert werden. Die Fluoreszenzintensitäten für 3006 (1,16), 3006K (1,24) und 3006G (1,34) unterschieden sich dabei nur gering. Vergleichbare Verstärkung der Aufnahme in Monozyten durch polyG-Motive läßt sich auch in komplexen Zellgemischen wie PBMZ beobachten (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 14

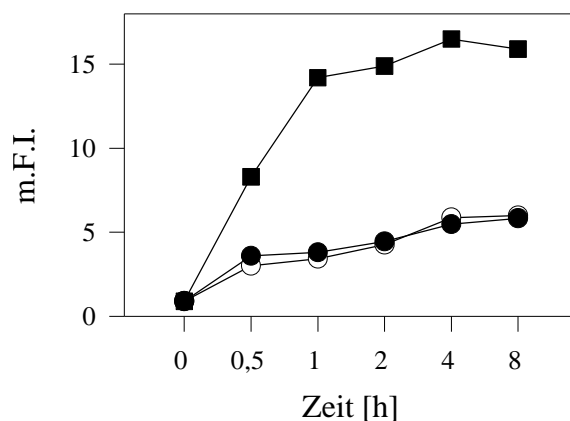


Abbildung 14: Aufnahme von Oligonukleotiden mit und ohne polyG-Motiven in Monozyten
 Monozyten ($1 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für unterschiedliche Zeiträume mit $10 \mu\text{M}$ der Biotin konjugierten ODN 3006 (◼), 3006K (○) und 3006G (●) inkubiert, gewaschen und permeabilisiert. Anschließend wurden die ODN mit Streptavidin-PE-Konjugaten gefärbt und die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Aufgrund der gewonnenen Daten stellt sich die Frage, ob die Aufnahme ein limitierender Schritt für die Aktivität ist und die erhöhte Internalisierung durch polyG-Motive auch mit gesteigerter Stimulationsfähigkeit korreliert. Dafür wurden PBMZ mit unterschiedlichen Konzentrationen der Oligonukleotide 2006, 3006 und 3006G stimuliert und nach 24 h die IL6-Produktion mittels ELISA bestimmt. Die ODN 2006 und 3006 unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer Stimulationsfähigkeit, was mit den Beobachtungen übereinstimmt, daß die Aktivität vermittelnden Motive die CG in Position 5 und 13 sind. Jedoch zeigen Kulturen, die mit 3006G behandelt wurden, trotz der erhöhten Aufnahme durch Monozyten keine Zunahme der IL6-Produktion (Abb. 15).

Das Anhängen von polyG-Motiven steigert die Aufnahme der Oligonukleotide in die Zellen, führt aber zu keiner Zunahme des stimulatorischen Potentials.

Abbildung 15

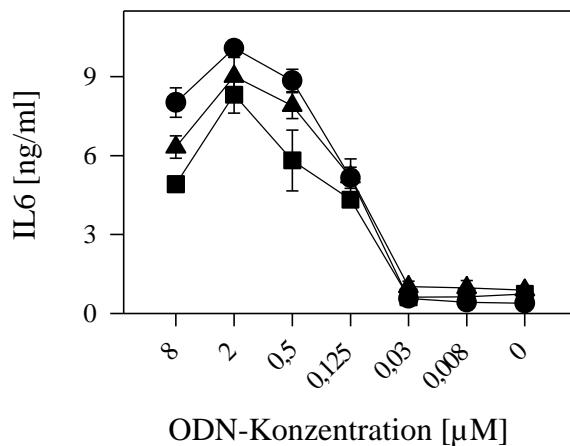


Abbildung 15: Vergleich der IL6-Produktion durch ODN mit und ohne polyG-Motiv
 PBMZ (5×10^6 /ml) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der ODN 2006 (●), 3006 (■) und 3006G (▲) inkubiert. Nach 24 h wurden die Konzentrationen von IL6 in den Kulturüberständen bestimmt. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen dar und sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.2.5 Synergismus mit LPS

Wie gezeigt, sind CpG-Oligonukleotide als auch LPS in der Lage Zytokine aus Monozyten freizusetzen. Jedoch unterscheiden sich beide Stimuli in ihrer Aktivität erheblich. Während

unter den von uns gewählten Experimentalbedingungen LPS bei einer optimalen Konzentration von 100 ng/ml aus Monozyten bis zu 600 ng/ml IL6 freisetzen kann, erzielt man mit bakterieller DNA nur um die 16 ng/ml. Da beide Agenzien als Bestandteile von Bakterien bei deren Zerstörung am Infektionsherd freigesetzt werden können, war es für uns von Interesse, ob es synergistische Effekte zwischen diesen beiden Signalen gibt.

Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen von LPS gegen variierende Mengen an Oligonukleotid 2006 titriert. Wie Abbildung 16A zu entnehmen ist, zeigt sich bei Konzentrationen von 1 und 10 ng/ml LPS durch die Zugabe steigender Konzentrationen von ODN 2006 eine Zunahme der IL6-Ausschüttung auf das ca. zweifache. Dies findet man jedoch auch bei Stimulation mit Oligonukleotiden wie AP1, die kein CpG-Motiv enthalten und keine oder nur geringe Eigenaktivität auf Monozyten zeigen (Abb. 16B). Aus diesem Grund wurden weitere 10 Oligonukleotide getestet. Alle zeigten, unabhängig davon ob sie ein CpG-Motiv enthielten oder nicht, Synergismus mit LPS (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 16

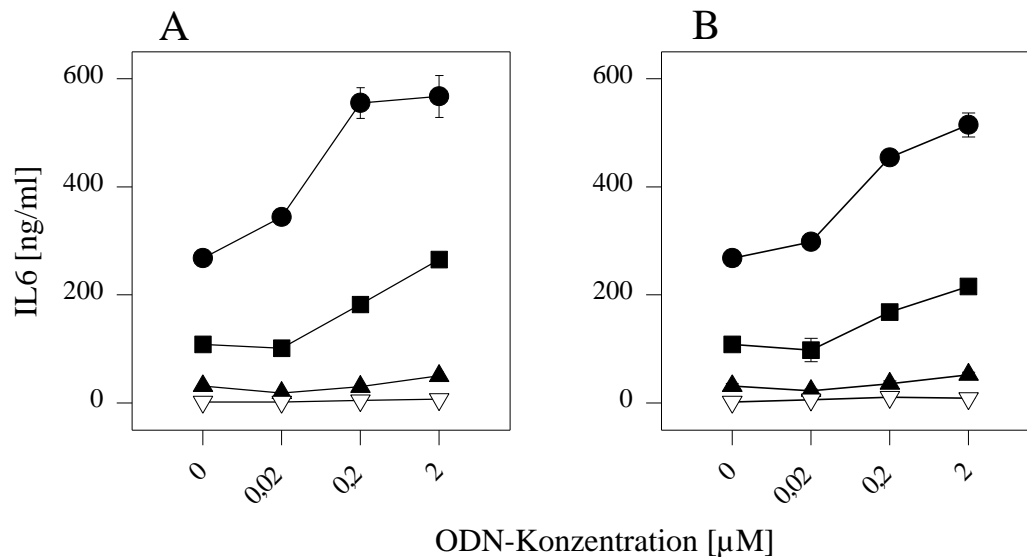


Abbildung 16: Synergistische Wirkung von LPS und Oligonukleotiden auf die Zytokinproduktion PBMZ (5×10^6 /ml) wurden gleichzeitig mit LPS und unterschiedlichen Konzentrationen der Oligonukleotide 2006 (A) und AP1 (B) stimuliert. Nach 24 h wurden die Kulturüberstände auf die produzierten IL6-Mengen mittels ELISA untersucht. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Kurven symbolisieren Kulturen mit 10 ng/ml LPS (●), 1 ng/ml LPS (■), 0,1 ng/ml LPS (▲) oder ohne LPS-Zugabe (▽).

Da die Reingewinnung von nicht aktivierten Monozyten ein arbeitsaufwendiger Prozess mit geringer Ausbeute ist, wurden die oben aufgeführten Experimente mit PBMZ durchgeführt. In kleinerem Rahmen durchgeführte Ansätze mit gereinigten Monozyten zeigten die gleichen Ergebnisse (Daten nicht dargestellt). Warum Oligonukleotide CpG unabhängig synergistische Wirkung mit LPS zeigen, konnte nicht geklärt werden.

3.2.6 Expression von kostimulatorischen und Antigen präsentierenden Oberflächenmolekülen

Neben der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, die über weite Distanzen wirken können, stellen Monozyten auch „Stimulanzen“ bereit, die für ihre Wirkung direkte Zell-Zell-Interaktionen benötigen. Diese membranständigen Moleküle ermöglichen vor allem die spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten. Zu ihnen zählt man Antigen präsentierende Moleküle wie MHC Klasse I und II und kostimulierende Rezeptoren wie CD86 (Slavik et al, 1999). Um eine produktive Interaktion dieser Moleküle mit ihren Bindungspartnern zu gewährleisten, ist es wichtig, den Kontakt zwischen den Zellen aufrecht zu erhalten. Hierzu dient eine Gruppe sogenannter Adhäsionsmoleküle. Ein Vertreter, der auf APZ exprimiert wird, ist das intrazelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM-1 = CD54). Des Weiteren exprimieren Monozyten Oberflächenantigene wie CD40, die sie selbst zum Ziel von Signalen anderer Immunzellen z.B. T-Zellen machen (van Kooten et al, 2000).

Um die Effekte von bakterieller DNA und von CpG-Oligonukleotiden auf diese Marker zu analysieren, wurden gereinigte Monozyten stimuliert. Als Vergleichsbasis dienten unstimulierte, kultivierte Monozyten. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD86, CD40, CD54, HLA-DR oder einem monomorphen Epitop von HLA-A, -B und -C gefärbt. Abb. 17 zeigt die CD86- Expression von Kulturen, die nicht stimuliert wurden oder unter Zusatz von 2006 und 2006K kultiviert wurden. Tabelle IV stellt eine Zusammenfassung der Stimulationsindices aktivierter Monozyten dar. EC DNA, nicht aber KT DNA induziert Expression von CD86, CD40, HLA-DR und HLA-ABC. Die Hochregulation von CD54 ist schwach, aber in unabhängigen Versuchen konstant meßbar. LPS wurde als Positivkontrolle benutzt und dient zum Vergleich. CpG-ODN induzieren

ebenfalls alle 5 Marker. Die Hochregulation von CD86 und MHC I und II ist CpG abhängig, jedoch zeigt das CpG-Oligonukleotid 1668 im Vergleich mit 2006 und DSP30 geringe Aktivität. CD40 wird zwar nach Stimulation stärker exprimiert, zeigt aber auch mit den Kontrolloligonukleotiden eine höhere Expression. CD54 wird wie durch EC DNA nur schwach hochreguliert.

Abbildung 17

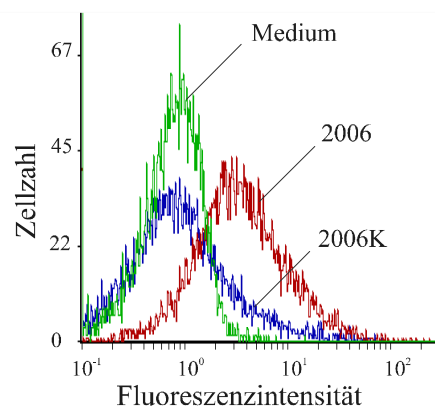


Abbildung 17: Beispiel für die Rezeptorhochregulation durch CpG-ODN
 Monozyten wurden mit Medium, 2006 oder 2006K kultiviert und nach 24 h das Oberflächenantigene CD86 gefärbt.

Tabelle IV

Stimulation	CD86	CD40	Stimulationsindex		
			CD54	HLA-DR	HLA-ABC
LPS	2,11	3,06	1,59	3,40	1,32
EC DNA	2,08	2,38	1,18	3,08	1,30
CT DNA	1,12	1,15	0,94	1,19	0,97
2006	3,62	2,48	1,27	2,11	2,23
2006K	0,81	1,52	1,05	1,06	1,06
DSP30	2,28	1,97	1,25	1,54	1,67
DSP30K	0,99	1,68	0,98	1,07	1,03
1668	1,43	0,95	1,18	1,38	1,22
1668K	1,07	0,85	1,01	1,21	1,11

Tabelle IV: Effekte von Oligonukleotiden auf die Expression von Oberflächenantigenen bei reinen Monozyten
 Monozyten (1×10^6 /ml) wurden in 24well-Platten für 24 h nur mit Medium, 10 ng/ml LPS, 15 µg/ml EC DNA oder KT DNA oder 0,2 µM Oligonukleotiden inkubiert. Die Zellen wurden mit FITC- oder PE-gekoppelten Antikörpern gegen CD86, CD40, CD54, HLA-DR, HLA-ABC und den korrespondierenden Isotypkontrollen gefärbt. Die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten wurden mittels FACS Analyse bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Stimulationsindices wurden wie unter Material und Methoden angegeben errechnet.

3.2.7 Blockierbarkeit der Zytokinfreisetzung durch Chloroquin

Wie bei B-Lymphozyten wurde die Abhängigkeit der Aktivität der CpG-ODN von der endosomalen Maturierung der Monozyten getestet.

In Vorversuchen mit isolierten Monozyten wurde die optimale Konzentration von Chloroquin mit 2 μM bestimmt (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 18A zu sehen, ist die Oligonukleotid induzierte IL6-Freisetzung vollständig durch den Zusatz von Chloroquin zu den Kulturen hemmbar. Hingegen hat die Base selbst in einer 100-fach höheren Konzentration keine Auswirkungen auf die IL6-Produktion durch LPS. Dieser Effekt ist nicht auf Chloroquin als stimulierendes Agens bei hohen Konzentrationen zurückzuführen, da Chloroquin per se zu keiner IL6-Ausschüttung führte (Abb. 18B). Die Oligonukleotid induzierte IL12-Ausschüttung ist ebenso Chloroquin sensitiv (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 18

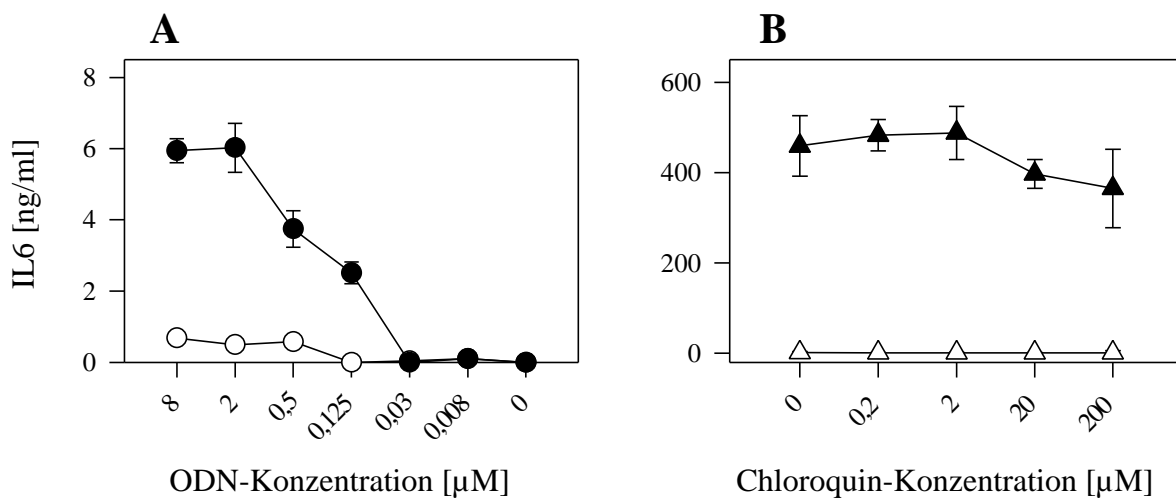


Abbildung 18: Effekte von Chloroquin auf CpG-Oligonukleotid und LPS induzierte IL6-Produktion in PBMZ (A) Monozyten ($1 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an CpG-ODN 2006 ohne (●) oder mit (○) 2 μM Chloroquin stimuliert. (B) Monozyten ($1 \times 10^6/\text{ml}$) wurden nur in Medium (△) oder mit 100 ng/ml LPS (▲) kultiviert und unterschiedliche Konzentrationen an Chloroquin eintitriert. Nach 24 h wurden in den Überständen die Konzentrationen an IL6 bestimmt. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

3.3 Effekte auf dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind hochspezialisierte Antigen präsentierende Zellen. Sie sind in der Lage, Gefahr durch Pathogene über „pattern recognition“-Rezeptoren zu detektieren, während sie fortlaufend Antigen aufnehmen. Am Infektionsherd können sie Chemokine und proinflammatorische Zytokine ausschütten, wodurch sie Zellen des angeborenen Immunsystems anlocken. Einmal aktiviert, wandern sie zu sekundären lymphatischen Organen und treten dort mit T-Zellen in Kontakt, um diese zu aktivieren und zur Expansion anzuregen.

Eine bereits gut definierte Population dendritischer Zellen mit solchen Eigenschaften bezeichnet man als myeloide dendritische Zellen, die GM-CSF responsiv sind und Oberflächenantigene wie CD11c, CD13 und CD33 exprimieren (O’Doherty et al, 1994). Sie lassen sich direkt aus Geweben oder peripherem Blut isolieren oder können aus Blutmonozyten mittels der Zytokine GM-CSF und IL4 generiert werden (Zhou et al, 1996).

Im Gegensatz zu myeloiden DZ, deren Vorläufer aus der myeloiden/monozytären Linie stammen, gibt es Hinweise darauf, daß lymphoide DZ gemeinsame Vorläufer mit T-Zellen haben (Res et al, 1999). Wie die T_H-Lymphozyten exprimieren sie CD4. Aufgrund der Expression von CD11c lassen sie sich weiter unterteilen. CD11c positive (CD11c+) lymphoide DZ ähneln myeloiden, da sie GM-CSF abhängig sind und CD13, CD33 und exprimieren. CD11c negative (CD11c-) lymphoide DZ zeigen einen zu ihnen unterschiedlichen Phänotyp. Sie sind abhängig von der Anwesenheit von IL3 und exprimieren die IL3 Rezeptor α -Kette (CD123), aber kein CD13 und CD33 (Kohrgruber et al, 1999). Sie wurden bisher in der Literatur unterschiedlich benannt wie plasmazytoide T-Zellen, natürliche Interferon Typ I produzierende Zellen (NIPZ) oder Vorläufer dendritische Zellen Typ 2 (pDZ2).

Sowohl myeloide als auch lymphoide CD11c- DZ wurden auf ihre Stimulierbarkeit mit CpG-Oligonukleotiden untersucht. Myeloide DZ wurden aus CD14+ Blutmonozyten generiert, lymphoide CD11c- DZ direkt aus Tonsillen isoliert.

3.3.1 Myeloide DZ

3.3.1.1 Charakterisierung der generierten Zellen

Myeloide DZ wurden aus Blutmonozyten durch Behandlung mit GM-CSF und IL4 differenziert. Die so behandelten Zellen befinden sich nach 7 Tagen Kultur bezüglich ihrer Oberflächenmarker in einem immaturren Zustand, sind LPS responsiv und können durch Zugabe von IL1 β , TNF, IL6 und Prostaglandin E2 ausgereift werden. Zur Überprüfung des Differenzierungsprotokolls wurden die Zellen am Tag 7 auf charakteristische Oberflächenmarker gefärbt. Sie sind positiv für CD1a, CD11c, CD13, CD33 und die GM-CSF Rezeptor α -Kette (CD116). Weiterhin weisen sie keine Expression von CD123, CD14, CD4 sowie von anderen Zelltyp definierenden Antigenen auf (Tab. V). Im Vergleich zu Monozyten können sie sehr effizient allogene T-Zellen zur Proliferation anregen (Abb. 19) und Bakterien phagozytieren (Daten nicht gezeigt).

Tabelle V

CD1a	+
HLA-DR	+++
CD11c	++
CD33	+
CD4	-
CD116 (GM-CSF R α)	+
CD123 (IL3 R α)	-
CD14	-
CD16	-
CD56	-
CD19	-
CD3	-

Tabelle V: Phänotypisierung der aus Monozyten differenzierten dendritischen Zellen

Immature dendritische Zellen wurden mit FITC- oder PE-markierten Antikörpern und den entsprechenden Isotypkontrollen gefärbt und mittels FACS die Expression der Oberflächenantigene ermittelt. Die Symbole beziehen sich auf die Erhöhung im Vergleich zu der Isotypkontrolle.

- = keine Erhöhung, + = bis 10fach, ++ = bis 50fach, +++ = über 50fach

Abbildung 19

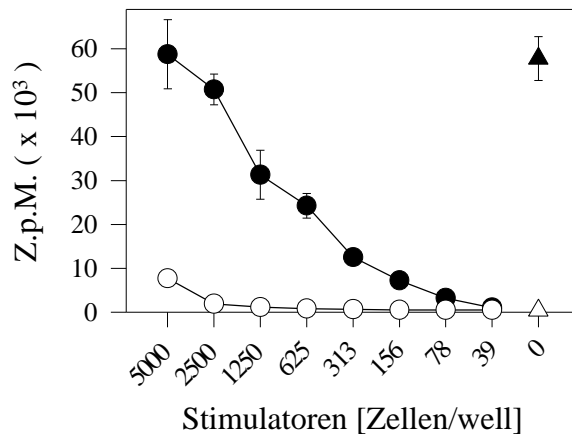


Abbildung 19: Aus Monozyten generierte DZ induzieren T-Zell-Proliferation
 Unterschiedliche Zellzahlen an myeloiden DZ (●) und frisch isolierten Monozyten (○) des Spenders A wurden für 4 Tage mit 50.000 reinen T-Zellen des Spenders B in 96well-Rundbodenplatten inkubiert. An Tag 4 wurde für 12 h [³H]-Thymidin zugesetzt. Als Negativkontrolle dienten T-Zellen ohne Stimulation (△), als Positivkontrolle T-Zellen, stimuliert mit TPA (10 nM) und Ionomycin (1 µM) (▲). Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen dar.

3.3.1.2 Effekte der CpG-ODN auf myeloide DZ

Wie schon für Monozyten wurden die Fähigkeit der myeloiden dendritischen Zellen zur Zytokinausschüttung, sowie zur Hochregulation von Oberflächenmarkern untersucht. Dafür wurden die Zellen mit 2 µM 2006, 50 µg/ml Escherichia coli DNA oder 100 ng/ml LPS inkubiert. Die Kulturüberstände wurden nach 8 h zur Bestimmung von TNF und nach 24 h für IL6, IL12, IL8 und IFNα abgenommen und die entsprechenden Zytokine mittels ELISA gemessen.

Ebenso wurden nach 24 h die Expression der Oberflächenantigene bestimmt. Weder 2006 noch EC DNA induzieren die untersuchten Zytokine (Tab. VIA). Ebenso kann man keine Hochregulation von CD86, CD40, HLA-DR oder HLA-ABC feststellen (Tab. VIB), noch kann die Fähigkeit allogene T-Zellen zu stimulieren durch die Zugabe von Oligonukleotid oder prokaryotischer DNA verbessert werden (Daten nicht gezeigt).

CD83 ist ein Oberflächenantigen, das mit der Ausreifung von DZ korreliert. Wie Tabelle VI entnommen werden kann, führen weder CpG-ODN noch EC DNA zu einer vermehrten Expression von CD83 und damit nicht zu einer Aktivierung oder einer Ausreifung immaturer myeloider DZ. Auch 1668, ein Oligonukleotid, das einen sehr potenten Stimulus für myeloide

DZ der Maus darstellt, erweist sich auf human DZ als nichtaktivierend (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu stellt LPS einen potenten Stimulus für die myeloiden DZ dar. TNF und IL8 werden in großen Mengen induziert, ebenso IL12 und IL6. Jedoch ist keine Sekretion von IFN α zu messen. Alle Aktivierungsmarker werden nach Stimulation mit LPS auf der Zelloberfläche vermehrt exprimiert und über 90% der Zellen werden positiv für CD83 (Tabelle VI).

Tabelle VI

A

Stimulation	Zytokine [ng/ml]				
	IL12	TNF	IL6	IL8	IFN α
Medium	0,02	0,00	0,00	0,03	0,01
2006	0,02	0,00	0,00	0,06	0,01
EC DNA	0,00	0,00	0,03	0,03	0,00
LPS	0,36	23,16	15,1	99,24	0,01

B

Stimulation	Durchschnittsfluoreszenzintensitäten				
	CD86	CD40	HLA-DR	HLA-ABC	CD83
Medium	3,1	3,3	90,4	82,5	3,8
2006	3,7	3,3	85,1	89,4	4,2
EC DNA	3,2	3,8	91,0	70,2	4,1
LPS	12,3	10,2	207,3	186,7	18,1

Tabelle VI: Effekte von LPS und DNA auf myeloide dendritische Zellen

Myeloide dendritische Zellen (1×10^6 /ml) wurden in 24well-Platten mit Medium, 2 μ M CpG-ODN 2006, 50 μ g/ml EC DNA oder 100 ng/ml LPS inkubiert. Die Kulturüberstände wurden für TNF nach 12 h und für IL12, IL6, IL8 und IFN α nach 24 h gesammelt und mittels ELISA die Zytokinkonzentrationen bestimmt. Die Zellen wurden mit FITC-markierten Antikörpern gegen CD86, CD40, HLA-DR, HLA-ABC oder CD83 gefärbt und die Durchschnittsfluoreszenzintensitäten mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei Experimente.

Die immaturren myeloiden DZ können, wie oben erwähnt, durch die Zugabe von IL1 β , TNF, IL6 und PG E2 ausgereift werden. So ausgereifte DZ weisen bereits hohe Expressionen der kostimulatorischen Marker auf, produzieren aber per se keine Zytokine. Auch diese maturaen

DZ können durch CpG-Oligonukleotide nicht zur Zytokinsekretion angeregt werden (Daten nicht gezeigt).

Die aus Monozyten gewonnenen DZ sind somit durch LPS aktivierbar, stellen aber keine Zielzellen für CpG-DNA dar.

3.3.2 Lymphoide CD11c- DZ

3.3.2.1 Vorversuche in PBMZ

Lymphoide CD11c- dendritische Zellen werden in der Literatur auch natürliche Interferon Typ I produzierende Zellen genannt, da sie die Hauptproduzenten von IFN α und IFN β nach Stimulation mit Viren oder bestimmten Bakterien darstellen (Siegal et al, 1999). Erste Hinweise darauf, daß diese DZ durch CpG-Oligonukleotide stimulierbar sind, ergaben sich aus dem Befund, daß in PBMZ nach Inkubation mit 2006 IFN α -Produktion nachweisbar ist. Wie schon bei myeloiden DZ beobachtet, führte LPS als ein etablierter Stimulus für monozytäre Zellen zu keiner IFN α -Freisetzung (Abb. 20).

Abbildung 20

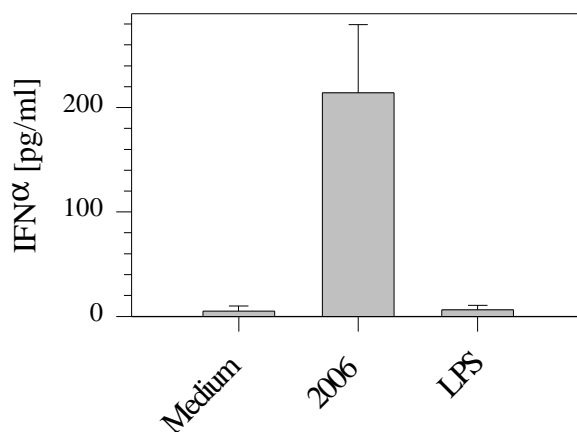


Abbildung 20: IFN α -Ausschüttung durch PBMZ

PBMZ (10×10^6 /ml) wurden für 24 h mit Medium, 2 μ M CpG-ODN 2006 oder 100 ng/ml LPS inkubiert. Die Kulturüberstände wurden abgenommen und die Konzentrationen von IFN α mittels ELISA bestimmt. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Neben den lymphoiden CD11c- DZ können auch Monozyten IFN α sezernieren. Ein bekannter Stimulus für IFN α aus Monozyten ist die doppelsträngige RNA pI:C. Vergleicht man die IFN α -Freisetzung von PBMZ mit PBMZ, die keine lymphoiden CD11c- DZ enthalten, nach Stimulation mit ODN 2006 oder EC DNA, so kann diese vollständig durch die Depletion unterbunden werden. Hingegen kann die pI:C induzierte IFN α -Sekretion nur partiell verringert werden. Die IL12-Werte der depletierten PBMZ, die durch CpG-DNA oder LPS freigesetzt werden, unterscheiden sich nicht von denen der nicht depletierten PBMZ (Tab. VII). Die CpG-DNA induzierte IFN α -Sekretion ist also abhängig von dem Vorhandensein der lymphoiden CD11c- DZ, während die Depletion dieser Zellen die Ausschüttung anderer Produkte der PBMZ wie IL12 nicht beeinflusst.

Tabelle VII

A

	IFN α [pg/ml]				
	Medium	2006	EC DNA	pI:C	LPS
PBMZ	3,0	129,6	207,7	1989,0	2,3
PBMZ, depletiert	4,5	3,3	2,0	1328,0	2,2

B

	IL12 [ng/ml]				
	Medium	2006	EC DNA	pI:C	LPS
PBMZ	0,01	0,68	1,04	0,00	3,53
PBMZ, depletiert	0,00	0,73	1,07	0,00	3,48

Tabelle VII: Depletion der lymphoiden CD11c- DZ in PBMZ unterbindet die CpG-DNA induzierte IFN α -Produktion vollständig

Die lymphoiden CD11c- DZ wurden aus PBMZ über die Expression von CD123 mittels der MACS-Technologie vollständig depletiert. PBMZ und so depletierte PBMZ (10×10^6 /ml) wurden für 24 h ohne Stimulation (Medium), mit 2 μ M CpG-ODN 2006, 50 μ g/ml EC DNA, 50 μ g/ml pI:C oder 100 ng/ml LPS inkubiert. Anschließend wurden die Konzentrationen von IFN α (A) und IL12 (B) in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die Daten stellen Durchschnittswerte von Doppelbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Lymphoide CD11c- DZ exprimieren in PBMZ als einziger Zelltyp die Oberflächenantigene CD4 und CD123 (IL3R α) und können somit über die Kombination dieser beiden Marker in der FACS-Analyse charakterisiert werden. Somit können auch in Zellgemischen wie PBMZ Änderungen der Oberflächenmarkerexpression bestimmter Zellen nach Stimulation verfolgt werden.

Untersucht man die Expression von CD86 und CD40 auf CD4+ CD123+ Zellen in PBMZ nach 24 h Inkubation mit ODN 2006, so stellt man für CD86 eine Hochregulation auf das 6,4-fache. Die Expression von CD40 steigt auf das 2,4-fache (Tab. VIII).

Tabelle VIII

Stimulation	Stimulationsindex	
	CD86	CD40
Medium	1,00	1,00
2006	6,40	2,41

Tabelle VIII: Hochregulation von CD86 und CD40 durch CpG-ODN 2006 auf lymphoiden CD11c- DZ in PBMZ
 PBMZ (10×10^6 /ml) wurden mit CpG-ODN 2006 stimuliert und nach 24 h mit Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Ak gegen CD4 und CD123 in Kombination mit CD86, CD40 gefärbt. Die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten für die Färbungen mit CD86, CD40 oder entsprechender Isotypkontrolle der CD4+CD123+ Population wurden mittels FACS Analyse bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Stimulationsindices wurden wie unter Material und Methoden angegeben ermittelt.

Ob die Zellen direkt durch das Oligonukleotid stimuliert werden oder auf einen von einem anderen Zelltyp produzierten Mediator reagieren, kann mit diesem Ansatz nicht unterschieden werden. Mögliche Mediatoren, die mit Maturierung von dendritischen Zellen in Verbindung gebracht werden und deren Produktion in PBMZ nach Stimulation mit CpG-DNA detektiert werden kann, sind TNF und IL6 (Sallusto et al, 1995; Drakesmith et al, 1998; Jonuleit et al; 1997). Ob diese Zytokine auch auf lymphoide CD11c- DZ wirken ist bisher noch nicht beschrieben. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die lymphoiden CD11c- DZ rein dargestellt.

3.3.2.2 Isolierung und Charakterisierung der lymphoiden CD11c- DZ

Die Frequenz der lymphoiden CD11c- DZ beträgt sowohl im peripheren Blut als auch in sekundären lymphatischen Geweben wie Tonsillen nur ca. 0,5% der Gesamtpopulation. Da CD123 auf den Zellen sehr stark exprimiert wird, bietet sich die Isolation der Zellen auf der Basis dieses Parameters an. Die Gewinnung der DZ erfolgte aus Tonsillen, da sie in diesen die einzige CD123 positive Population sind.

Als Voranreicherungsschritt wurde die Separation mittels der MACS-Technologie gewählt. Dabei werden Zellen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern markiert und diese mit anti-Antikörpern gegengefärbt, die mit paramagnetischen Metallkugeln konjugiert sind. Anschließend werden die markierten Zellen in einem starken Magnetfeld in Metallmatrizen zurückgehalten und lassen sich separieren. Die lymphoiden CD11c- DZ können mit dieser Methode auf der Basis der CD123 Expression bis maximal 50% angereichert werden. Die vollständige Reindarstellung erfolgte über Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS) ebenfalls nach dem Marker CD123. Man erreicht dadurch Reinheiten über 98%. Die so gewonnenen Zellen zeigen folgenden Phänotyp. Sie sind negativ für Antigene, die Zelltypen wie T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten und NK Zellen definieren (CD3, CD19, CD14 und CD56), ebenso für dendritische Marker wie CD1a, CD11c, CD13 und CD33. Sie exprimieren CD4, MHC II und die α -Untereinheit des IL3 Rezeptors (CD123), jedoch nicht die α -Untereinheit des GM-CSF Rezeptors (CD116) (Abb. 21).

Abbildung 21

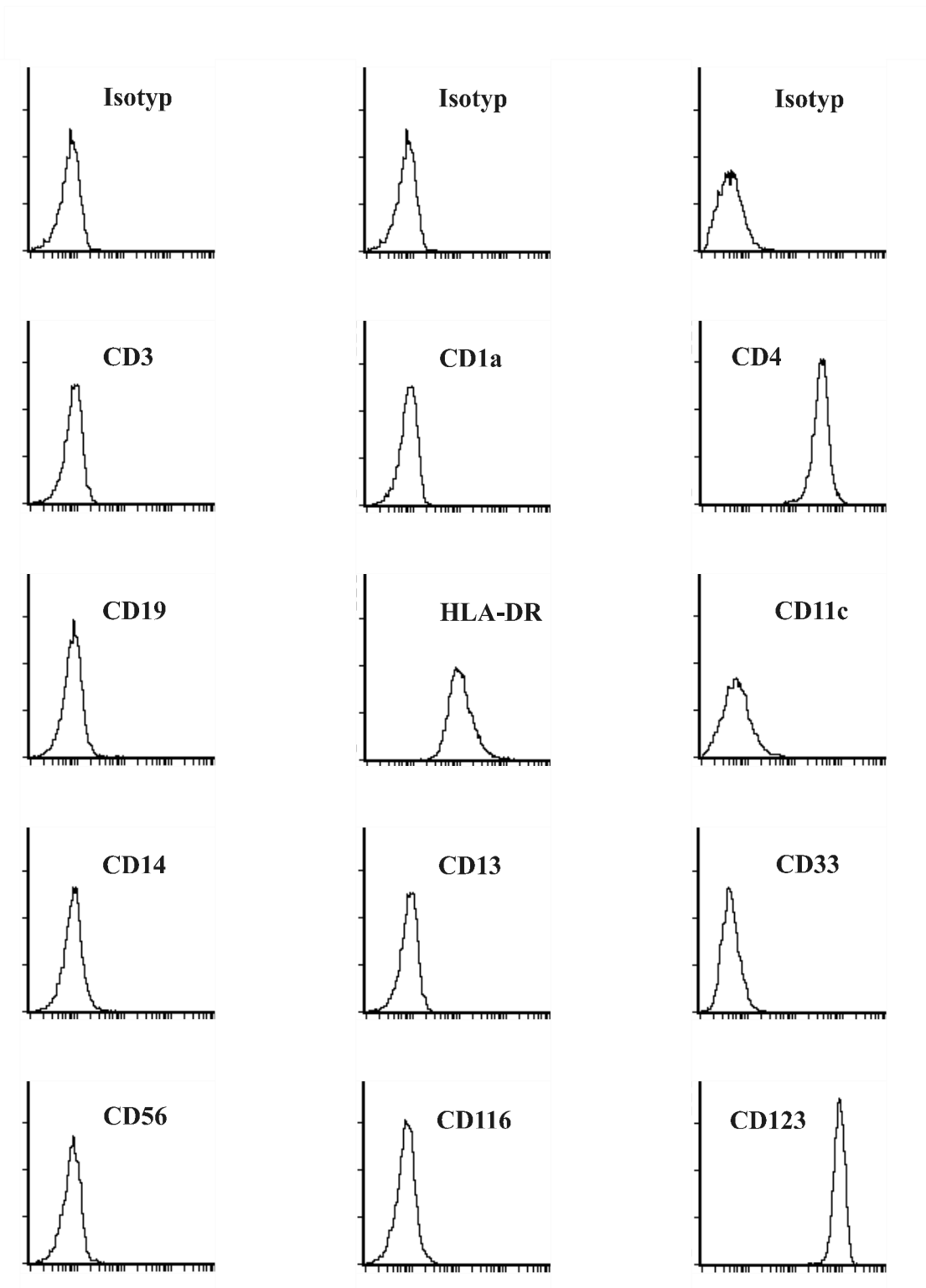


Abbildung 21: Phänotypisierung der lymphoiden CD11c- DZ
 Reine lymphoide CD11c- DZ wurden mit den angegebenen Fluorochrom konjugierten monoklonalen Antikörpern gefärbt und die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten gemessen.

3.3.2.3 CpG-ODN und bakterielle DNA verhindern Apoptose der DZ

Isoliert man die lymphoiden CD11c- DZ so sterben innerhalb von 24 h fast alle Zellen. Als einziger Faktor, der ein Überleben der Mehrheit der Zellen garantiert, wird in der Literatur IL3 beschrieben. Ebenso führt die Gabe von GM-CSF oder die Ligation von CD40 durch CD40L exprimierende Fibroblasten zu einer, wenn auch geringer ausgeprägten Rettung der Zellen vor dem programmierten Zelltod. Fügt man den Kulturen CpG-Oligonukleotid oder *Escherichia coli* DNA zu, so überleben wie mit IL3 ca. 75% der Zellen. Dieser Effekt ist CpG-Motiv spezifisch, da durch die Inversion der CpG in 2006 (2006K) oder die Zugabe des ODN AP1 das Überleben drastisch gesenkt wird. Ebenso führt ein Verdau der EC DNA zu einem totalen Verlust der Aktivität. Bewährte Stimuli für Antigen präsentierende Zellen wie LPS, aber auch doppelsträngige RNA wie poly I:C führen nur zu einer schwach erhöhten Überlebensrate (Abb. 22).

Abbildung 22

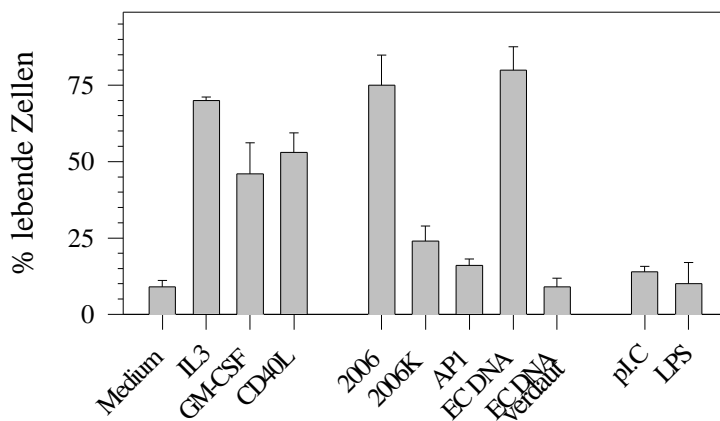


Abbildung 22: Verhinderung der spontanen Apoptose reiner lymphoide CD11c- DZ durch CpG-DNA
 Reine lymphoide CD11c- DZ (20×10^3 /well) wurden in 96well-Rundbodenplatten mit 500 U/ml IL3, 1000 U/ml GM-CSF, 20×10^3 CD40L transgenen 3T3 Zellen, 2 μ M ODN 2006, 2006K, AP1, 50 μ g/ml EC DNA oder verdauter EC DNA, 50 μ g/ml poly I:C oder 100 ng/ml LPS stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen nur in Medium. Nach 24 h wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und die Prozentsätze der lebenden Zellen (Propidiumiodidfärbung negative) per FACS analysiert. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von drei unabhängige Experimente.

Neben der spontanen Apoptose lymphoide CD11c- DZ durch das Fehlen von Faktoren ist für lymphoide CD11c- DZ auch die induzierte Apoptose durch IL4 bekannt (Rissoan et al, 1999).

So können Zellen, die mit IL3 am Leben gehalten werden, durch die Zugabe von IL4 abgetötet werden. Sowohl CpG-Oligonukleotid 2006 als auch EC DNA schützen gegenüber dieser aktiven Elimination (Abb. 23). GM-CSF und CD40-Ligation jedoch besitzen diese Eigenschaften nicht. Während IL3 neben einem Signal zum Überleben auch einen Stimulus zur Zellteilung darstellt, sind weder ODN 2006, EC DNA noch GM-CSF oder CD40-Ligation in der Lage [³H]-Thymidininkorporation zu induzieren (Abb. 24).

Abbildung 23

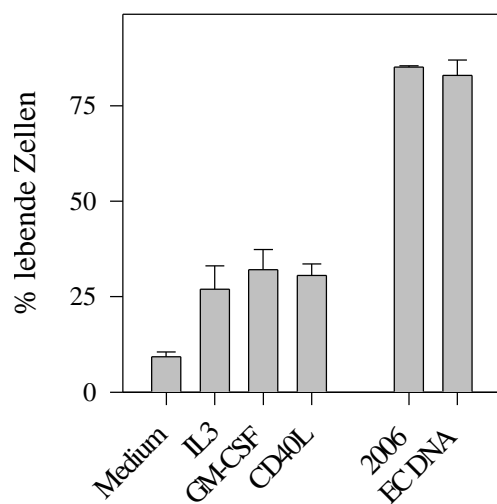


Abbildung 23: Verhinderung der IL4 induzierten Apoptose lymphoider CD11c- DZ durch CpG-DNA
 Reine lymphoide CD11c- DZ (20×10^3 /well) wurden in 96well-Rundbodenplatten mit Medium allein, 500 U/ml IL3, 1000 U/ml GM-CSF, 20×10^3 CD40L transgenen 3T3 Zellen, 2 μ M ODN 2006 oder 50 μ g/ml EC DNA stimuliert. Allen Kulturen wurden 800 U/ml IL4 zugesetzt. Nach 24 h wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und die Prozentsätze der lebenden Zellen (Propidiumiodidfärbung negative) per FACS analysiert. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von drei unabhängige Experimente.

Abbildung 24

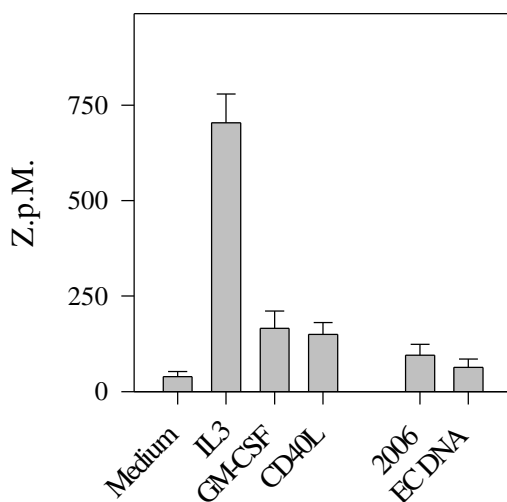


Abbildung 24: Proliferation reiner lymphoider CD11c- DZ
 Reine lymphoide CD11c- DZ (20×10^3 /well) wurden in 96well-Rundbodenplatten mit Medium allein, 500 U/ml IL3, 1000 U/ml GM-CSF, 20×10^3 bestrahlte CD40L transgenen 3T3 Zellen, 2 μ M ODN 2006 oder 50 μ g/ml EC DNA stimuliert. Nach 54 h wurden den Kulturen [³H]-Thymidin zugesetzt und für weitere 16 h inkubiert. Anschließend wurde die Inkorporation der Radioaktivität in die DNA bestimmt. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von drei unabhängige Experimente.

3.3.2.4 CpG-DNA induzierte morphologische Veränderungen der CD11c-lymphoiden DZ

Einer der auffälligsten Effekte von CpG-DNA auf diese Zellen ist die morphologische Veränderung. In Kultur mit ODN 2006, EC DNA oder IL3 formen die Einzelzellen innerhalb weniger Stunden große Aggregate. Diese Zellhaufen sind in Kulturen mit Kontroll-DNA, LPS oder pI:C nicht zu beobachten. Auch auf der Ebene der einzelnen Zelle kommt es durch die Stimulation zu einer morphologischen Differenzierung. Zum Zweck der Darstellung wurden Zytospins hergestellt und die Zellen Giemsa gefärbt. Die Zellen sind direkt nach der Isolation rund und das Zytoplasma ist homogen (Abb. 25A). Obwohl IL3 anti-apoptotisch wirkt, verändert sich das Erscheinungsbild der Zellen nach 36 h Inkubation mit IL3 kaum. Es bilden sie nur sehr schwach Ausläufer und das Zytoplasma weist hellere Bereiche auf. Die Zellen nehmen leicht an Größe zu (Abb. 25E). Inkubation mit EC DNA (Abb. 25B) oder ODN 2006 (Abb. 25C und D) fördert die Ausbildung langer dendritischer Fortsätze. Der Bereich des Zytoplasma ist gefüllt mit großen Vakuolen, der Zellkern unregelmäßig geformt und auch hier zeigen sich Bereiche unterschiedlicher Dichte. Auf dieselbe Weise verändert sich die Erscheinungsform der Zellen, wenn sie mit IL3 in der Kombination mit CD40-Ligation aktiviert werden (Abb. 25F). Die Stimulierung mit IL3 plus pI:C (Abb. 25G) oder LPS (Abb. 25H) zeigt im Vergleich zu IL3 alleine keine Veränderung.

3.3.2.5 Aktivierung der CD11c- lymphoiden DZ durch CpG-DNA

In PBMZ konnte nach Stimulation durch CpG-DNA eine Hochregulation von CD86 und CD40 auf den lymphoiden CD11c- DZ festgestellt werden. Für einige der durch CpG-DNA induzierten Zytokine wie TNF ist bekannt, daß sie auf myeloiden DZ zu einer erhöhten Expression von kostimulatorischen Oberflächenantigenen führen (Chen et al, 1998). Auf reinen lymphoiden CD11c- DZ sollte die Frage beantwortet werden, ob es auch ohne die von anderen Zelltypen produzierten Mediatoren durch CpG-DNA zu einer verstärkten Expression der Oberflächenmoleküle kommt. Da neben CpG-DNA und CD40-Ligation auch pI:C und LPS verwendet wurden, wurden allen Kulturen IL3 zugesetzt, um das Überleben der Zellen zu garantieren. Kulturen mit IL3 allein dienten als Vergleichsbasis.

Abbildung 25

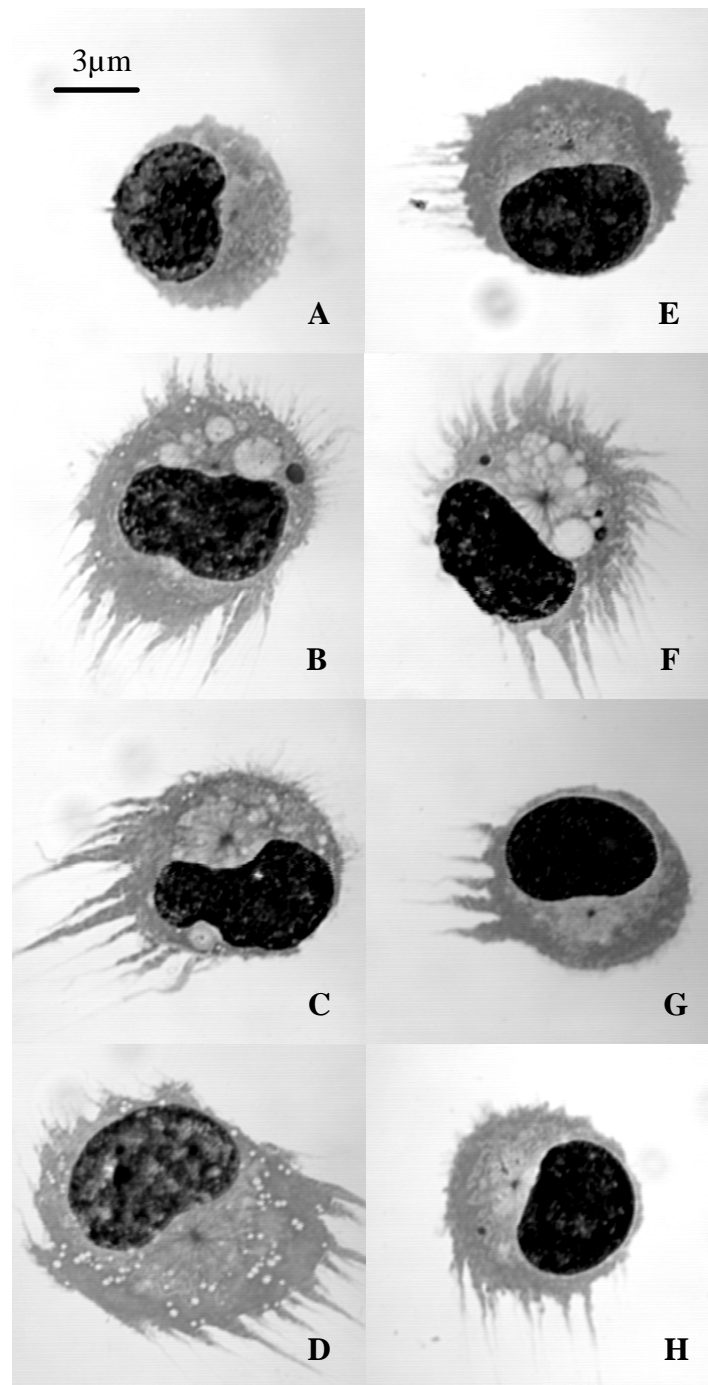


Abbildung 25: Morphologie der lymphoiden CD11c- DZ nach Inkubation mit unterschiedlichen Stimuli
Reine lymphoide CD11c- DZ (20×10^3 /well) wurden frisch (A) oder für 36 h kultiviert mit EC DNA (B), 2006 (C und D), IL3 (E), CD40L transgenen 3T3 Zellen plus IL3 (F), pI:C plus IL3 (G) oder LPS plus IL3 (H). Es wurden Cytospinpräparate hergestellt, mit May-Giemsa-Lösung gefärbt und mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop analysiert.

ODN 2006 und EC DNA regulierten auf der Zelloberfläche die Präsentationsmoleküle HLA-DR und HLA-ABC, sowie die Kostimulationsmoleküle CD80 (Daten nicht gezeigt) und CD86 hoch. Das für die Aktivierung von APZ wichtige CD40 wird nach CpG-Stimulation ebenfalls stärker exprimiert. Ein ähnliches Muster findet man nach Kokultivierung mit CD40L transgenen Fibroblasten. DZ, die mit ODN AP1 oder verdauter EC DNA kultiviert wurden, zeigten keine Steigerung für die oben genannten Moleküle. Ebenso waren weder LPS noch pI:C in der Lage die Zellen zu aktivieren (Abb. 26).

Abbildung 26

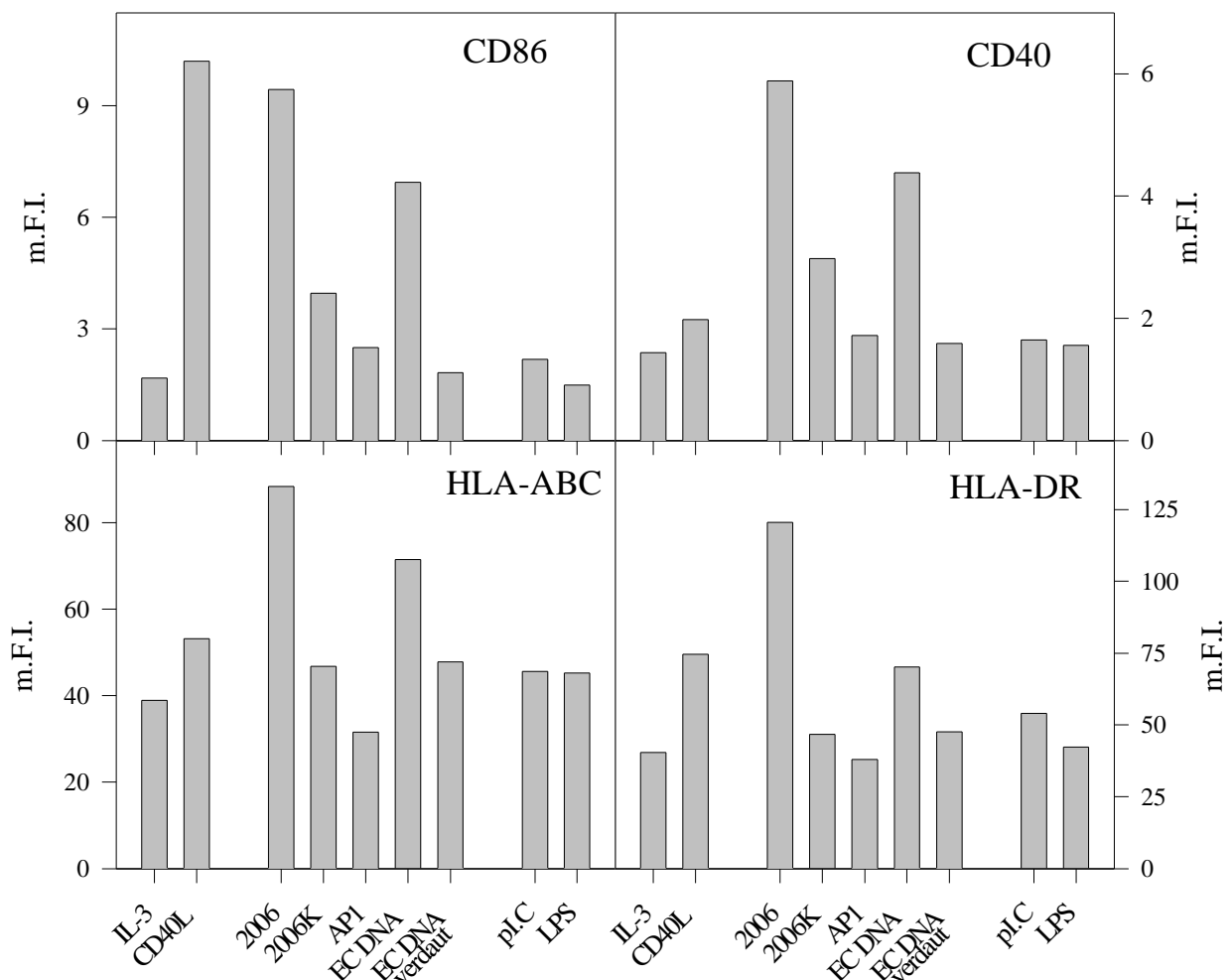


Abbildung 26: Expression von Oberflächenantigenen reiner lymphoider CD11c- DZ
 Reine lymphoide CD11c- DZ (200×10^3 /well) wurden in 24well-Platten mit 200×10^3 CD40L transgenen 3T3 Zellen, 2 μ M ODN 2006, 2006K, AP1, 50 μ g/ml EC DNA oder verdauter EC DNA, 50 μ g/ml poly I:C oder 100 ng/ml LPS stimuliert. Allen Kulturen wurden 500 U/ml IL3 zugesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen nur mit IL3. Die Zellen wurden mit FITC-gekoppelten Antikörpern gegen CD86, CD40, HLA-DR, HLA-ABC und den korrespondierenden Isotypkontrollen gefärbt. Die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten wurden mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.3.2.6 Zytokinfreisetzung reiner lymphoider CD11c- DZ

Die Versuche mit PBMZ und PBMZ, in denen die lymphoiden CD11c- DZ depletiert wurden, deuten darauf hin, daß lymphoide CD11c- DZ die Quelle für IFN α nach Stimulation mit CpG-DNA sind. IFN α spielt wie TNF und IL12 bei der Aktivierung von NK Zellen, Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, eine Rolle. Weiterhin hat es die Potenz humane naive T_H-Lymphozyten zu T_H1-Zellen zu differenzieren. Das prominenteste Zytokin zur Differenzierung zu T_H1-Immunantworten ist IL12. Chemokine wie IL8 locken Zellen des Immunsystems zu den Orten der Entzündung. GM-CSF ist ein Wachstumsfaktor und immobilisiert Progenitorzellen aus dem Knochenmark. Dabei fördert es vor allem die Differenzierung zu dendritischen Zellen.

Die Freisetzung dieser Zytokine von reinen lymphoiden CD11c- DZ wurde nach Gabe unterschiedlicher Stimuli überprüft. Alle Kulturen wurden unter dem Zusatz von IL3 gehalten, um das Überleben der Zellen zu gewährleisten. IL3 alleine führt zu keiner Freisetzung der Zytokine. Die Ligation von CD40 führte mit Ausnahme von IL8 ebenfalls zu keiner signifikant unterschiedlichen Sekretion. ODN 2006 und EC DNA führten zur Freisetzung von TNF, IL8, GM-CSF und IFN α ($p \leq 0,05$, teilweise $p \leq 0,01$) im Vergleich zu IL3 alleine. Die Kontrollen 2006K, AP1 und verdaute EC DNA hingegen führten zu einer deutlich geringeren Zytokinsekretion. pI:C war nicht in der Lage TNF, IL8 oder GM-CSF zu induzieren, war aber der potenteste Stimulus für IFN α . LPS war wie in den vorangegangenen Tests kein Aktivator für lymphoide CD11c- DZ (Abb. 27).

IL12 konnte mit keinem der Agenzien induziert werden (Daten nicht gezeigt).

CpG-DNA aktivierte lymphoiden CD11c- DZ produzieren die Zytokine TNF, GM-CSF und IFN α (Sallusto et al, 1995; Drakesmith et al, 1998; Luft et al, 1998). Diese drei Zytokine haben das Potential der Aktivierung und Maturierung von myeloiden dendritischen Zellen. Bisher gibt es aber noch keine Befunde, daß sie diese mit Hochregulation von Markern wie CD86 einhergehenden Veränderungen auch auf lymphoiden CD11c- DZ induzieren können. Wie in Abbildung 28 dargestellt ist die Hochregulation von CD86 nicht auf die autokrine Wirkung der getesteten Zytokine zurückzuführen, da die Zugabe dieser nicht zu einer Erhöhung der CD86-Expression führt. Vielmehr scheint es sich um einen direkten Effekt der CpG-DNA zu handeln.

Abbildung 27

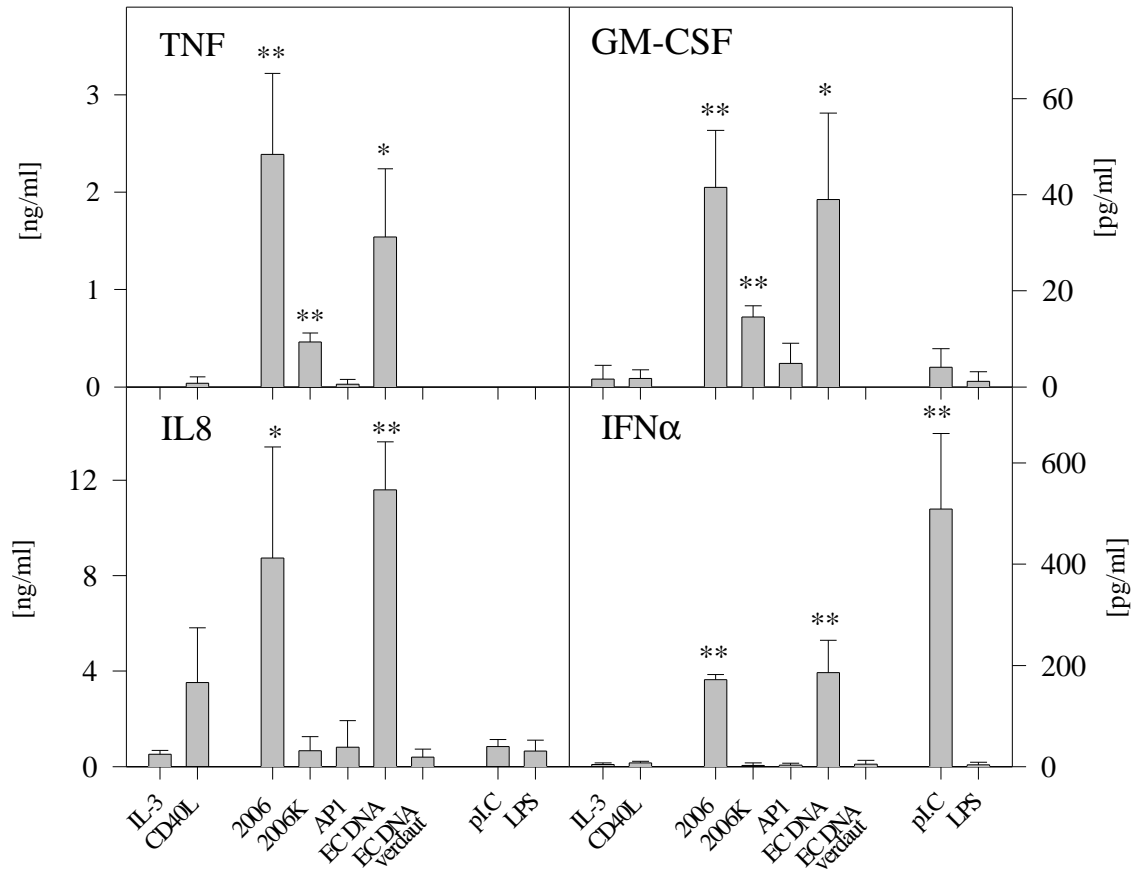


Abbildung 27: Zytokinproduktion reiner lymphoider CD11c- DZ

Reine lymphoide CD11c- DZ (200×10^3 /well) wurden in 24well-Platten mit 200×10^3 CD40L transgenen 3T3 Zellen, $2 \mu\text{M}$ ODN 2006, 2006K, AP1, $50 \mu\text{g/ml}$ EC DNA oder verdauter EC DNA, $50 \mu\text{g/ml}$ poly I:C oder 100 ng/ml LPS stimuliert. Allen Kulturen wurde 500 U/ml IL3 zugesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen nur mit IL3. Für die Bestimmung von TNF wurden nach 12 h Überstände abgenommen, für IL8, GM-CSF und IFNα nach 36 h. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte +/- Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzunterschiede zwischen der IL3-Behandlung und den Testbehandlungen sind als T-Test Werte $p < 0.05$ (*) oder $p < 0.01$ (**) dargestellt.

Abbildung 28

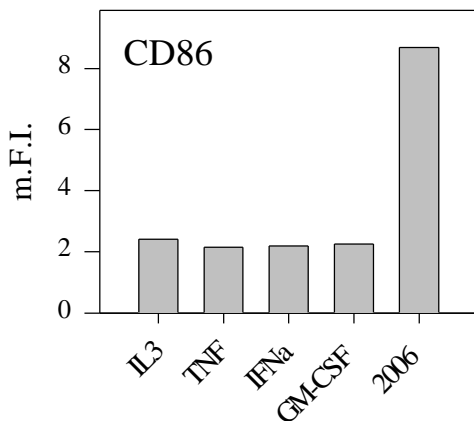


Abbildung 28: Abhängigkeit der CD86-Expression der lymphoiden CD11c- DZ von CpG-ODN induzierten Zytokinen

Reine lymphoide CD11c- DZ (200×10^3 /well) wurden in 24well-Platten mit 1000 U/ml TNF, 1000 U/ml IFNα, 1000 U/ml GM-CSF oder $2 \mu\text{M}$ ODN 2006 stimuliert. Allen Kulturen wurden 500 U/ml IL3 zugesetzt. Nach 36 h wurden die Zellen mit αCD86 gefärbt und die Expression von CD86 im FACS analysiert.

3.3.2.7 Einfluss von IFN Typ I auf B-Zell-Proliferation

Die Expansion von B-Zellen stellt einen Grundmechanismus zur Amplifikation von spezifischen Immunreaktionen dar. Wie in Kapitel 1.1.2 dargestellt, sind CpG-Oligonukleotide Mitogene für reine B-Zellen. Ebenso ist die CpG induzierte Proliferation in PBMZ auf B-Zellen zurückzuführen.

Für die Versuche mit PBMZ wurden 100000 Zellen pro Well eingesetzt, was 5000 bis 10000 B-Zellen entspricht. Um etwa den gleichen [³H]-Thymidineinbau mit reinen B-Lymphozyten zu erreichen, sind 50000 Zellen nötig, also das 5- bis 10-fache. Eine zweite Zellpopulation in PBMZ, die auf die Stimulation mit CpG-DNA proliferiert, konnte jedoch nicht gefunden werden. B-Zellen sind die einzige Population, die CpG abhängig CD71 exprimieren, eine Oberflächenantigen, das mit Proliferation assoziiert ist. Zusätzlich lässt sich in B-Zellen depletierten PBMZ keine Proliferation nach ODN-Gabe nachweisen.

Eine zweite Möglichkeit ist die Verstärkung der B-Zell-Proliferation durch ein ebenfalls CpG stimuliertes Produkt eines anderen Zelltyps. Kandidaten dafür sind die Interferone α und β , ein Produkt CpG-ODN aktivierter lymphoider CD11c- dendritischer Zellen. Der Begriff Interferon α umfaßt eine Gruppe von 12 unterschiedlichen Proteinen, Interferon β hingegen ist ein Protein. Alle binden an den selben Rezeptor, jedoch sind die Effekte, die sie auslösen, qualitativ und quantitativ unterschiedlich. So kann IFN α 8 B-Zell-Rezeptor induzierte Proliferation sehr effizient kostimulieren, IFN α 1 nicht (Hibbert et al, 1999). Interferone des Typs I haben ohne einen zweiten Stimulus für die B-Zellen keine mitogene Wirkung.

Um B-Zellen rein zu gewinnen, wurden die lymphoiden CD11c- DZ aus Tonsillenzellen mit der MACS-Technologie depletiert. Aus der so gewonnenen Population wurden die B-Zellen ebenfalls über MACS-Sortierung gewonnen. Die B-Zellen waren über 98% rein und in 100000 analysierten Zellen konnte keine lymphoide CD11c- DZ nachgewiesen werden. Stimuliert man die B-Zellen mit dem CpG-Oligonukleotid 2006, so kann nach 4 Tagen B-Zell-Proliferation gemessen werden (9931 Z.p.M.). Durch die Zugabe eines universellen Typ I Interferons wird die Proliferation bis zu 2,5-fach gesteigert. Das universelle Typ I Interferon ist ein Hybrid aus IFN α 2a und IFN α 1 und zeigt eine Vielzahl der Interferon Typ I spezifischen Effekte. Durch die Kokultivierung mit lymphoiden CD11c- DZ zeigte sich dieselbe Proliferationssteigerung in 2006 behandelten Kulturen.

In Vorversuchen wurde die Abhängigkeit von der Konzentration des Zytokins bzw. Zahl der lymphoiden CD11c- DZ festgestellt. Die optimale Konzentration an IFN Typ I konnte auf 1000 U/ml festgelegt werden. Die Zahl der lymphoiden CD11c- DZ wurde auf 1000/well festgelegt (Daten nicht gezeigt). Die CpG-DNA induzierte B-Zell-Proliferation in reinen B-Lymphozyten kann durch die Zugabe von blockierenden Antikörpern gegen IFN α und IFN β nicht reduziert werden. Typ I Interferon oder lymphoide CD11c- DZ alleine induzieren keine B-Zell-Proliferation (Abb. 29A). In PBMZ kann die durch ODN 2006 ausgelöste Proliferation durch die Zugabe von blockierenden Antikörpern gegen IFN α und IFN β auf etwa 25% vermindert werden (Abb. 29B). Weiterhin zeigte das Kontroll-ODN AP1, das weder zu Proliferation noch zu IFN α -Ausschüttung induziert, mit rekombinanten IFN Typ I keinen synergistischen Effekt (Abb. 29A und B).

Die Proliferation der B-Zellen in einem komplexen Zellgemisch wie PBMZ läßt sich somit auf zwei Effekte zurückführen. CpG-DNA induziert direkt die B-Zell-Vermehrung. Diese direkte Wirkung der DNA wird unterstützt durch die CpG abhängige Ausschüttung von Typ I Interferonen durch lymphoide CD11c- DZ.

Abbildung 29

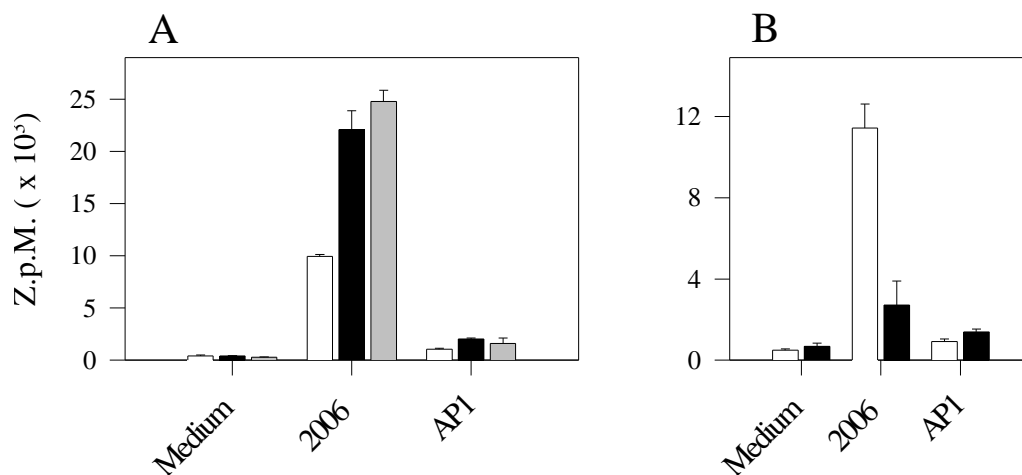


Abbildung 29: Einfluss von CpG-DNA induzierter IFN Typ I-Produktion auf die B-Zell-Proliferation
 (A) Reine B-Lymphozyten (50×10^3 /well) wurden in 96well-Rundbodenplatten nur in Medium oder mit $2 \mu\text{M}$ Oligonukleotid 2006 bzw. AP1 inkubiert (weiße Balken). Zusätzlich wurde den Kulturen 1000 U/ml IFN Typ I (schwarze Balken) oder 1000 Zellen/well lymphoide CD11c- DZ (graue Balken) zugegeben.
 (B) PBMZ (100×10^3 /well) wurden in 96well-Rundbodenplatten nur in Medium oder mit $2 \mu\text{M}$ Oligonukleotid 2006 bzw. AP1 inkubiert (weiße Balken). Zusätzlich wurde den Kulturen 1000 nU/ml eines neutralisierenden α IFN Typ I-Antikörpers zugegeben (schwarze Balken).
 An Tag 4 wurde den Kulturen [^3H]-Thymidin zugesetzt und nach 6 h die Inkorporation gemessen. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen dar und sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.4 Indirekte Effekte von CpG-Oligonukleotiden auf Zellen des Immunsystems

In vorhergehenden Kapiteln wurde die stimulatorische Wirkung der CpG-DNA auf Antigen präsentierende Zellen dargelegt. Als Modell für CpG-Motive enthaltende DNA bakteriellen Ursprungs konnten synthetische Oligonukleotide verwendet werden.

Was diese Aktivierung der APZ aber für das Immunsystem als komplexes Netzwerk interagierender Zellen bedeutet, blieb dabei vollkommen unbeantwortet. Aktivierte APZ präsentieren die prozessierten Antigene T-Zellen und stellen für diese Interaktion kostimulatorische Moleküle zur Verfügung. Ebenso dienen die von ihnen produzierten Effektorzytokine zu einer Verstärkung der Aktivierung und steuern die Differenzierung der T-Lymphozyten. Die CpG-DNA stimulierten APZ sind für diese Aufgabe optimal gerüstet. Zuerst jedoch sollte die Frage beantwortet werden, ob CpG-Oligonukleotide per se T-Zellen stimulieren können oder kostimulatorische Aktivität für sie zeigen.

3.4.1 CpG-Oligonukleotide aktivieren T-Zellen nicht direkt

Um das Potential von CpG-DNA auf T-Zellen untersuchen zu können, wurden gereinigte T-Zellen mit ODN alleine oder in der Kombination mit einem T-Zell-Rezeptor-Stimulus behandelt. Die Reaktivität der T-Zellen wurde mittels Proliferation und der Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD69 überprüft. Auf gereinigten T-Zellen führte α CD3 sowohl zur Proliferation der Zellen als auch zur verstärkten Expression von CD69. Das CpG-Oligonukleotid 1668 allein führte jedoch weder zum [3 H]-Thymidineinbau (Abb. 30A), noch zu CD69-Expression auf der Zelloberfläche (Abb. 30B). Die Kombination der beiden Stimuli führte zu keiner Erhöhung der α CD3 induzierten Effekte.

Abbildung 30

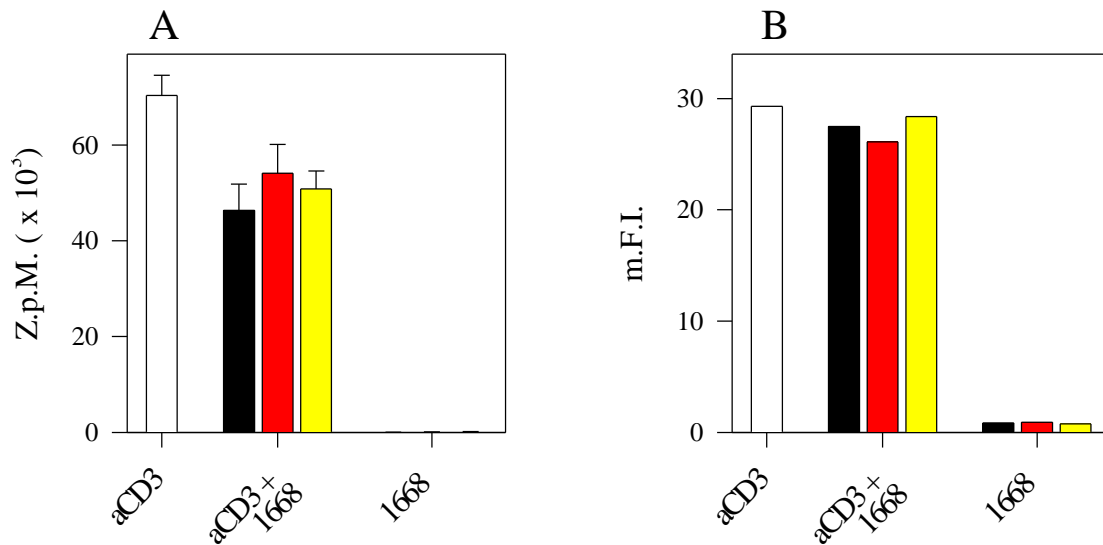


Abbildung 30: Proliferation reiner T-Lymphozyten

Reine T-Lymphozyten (50×10^3 /well) wurden mit plattengebundenen α CD3, CpG-ODN 1668 oder einer Kombination aus beiden Stimuli kultiviert.

(A) Die Bestimmung des [³H]-Thymidineinbaus erfolgte am Tag 4. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus Vierfachansätzen und sind repräsentativ für drei Experimente.

(B) Nach 24 h wurden die Zellen auf die Expression von CD69 gefärbt und die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten per FACS bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für drei Experimente.

3.4.2 CpG abhängige Stimulation von T-Zellen und NK Zellen in PBMZ

Verwendet man anstatt gereinigter T-Zellen Peripherblut mononukleäre Zellen, also ein komplexes Gemisch aus APZ, B- und T-Lymphozyten sowie NK Zellen, findet man eine erhöhte Expression von CD69 durch die Stimulation mit CpG-ODN. Diese Aktivierung ist CpG spezifisch, da sie bei der Zugabe von 2006K und AP1 nicht auftritt. Die Erhöhung der Durchschnittsfluoreszenz, die direkt mit der Menge an Antigen auf der Zelloberfläche korreliert, ist auf den T-Zellen nur sehr gering (Abb. 31A), die prozentuale Verteilung der reagierenden T-Zellen jedoch liegt bei über 10% (Abb. 31B). Neben den T-Zellen reagieren auch die NK Zellen des Blutes auf die Zugabe von Oligonukleotiden CpG spezifisch, was sich anhand der Hochregulation von CD69 auf einer CD16+ CD56+ Population zeigen läßt (Abb. 31C). Über die Expression von CD16 und CD56 können NK Zellen in PBMZ identifiziert werden.

Zytokine, die mit der Aktivierung von T-Lymphozyten und NK Zellen in Verbindung gebracht werden, sind Interleukin 12 und IFN α und β (Ballas et al, 1996). LPS, ein starker Induktor für IL12, und pI:C, doppelsträngige RNA, die zur Produktion von TypI Interferonen führt, führen wie CpG-DNA in PBMZ zur Hochregulation von CD69 auf T-Zellen und NK Zellen (Abb. 31). Katharina Kranzer konnte zeigen, daß unter der Verwendung eines T-Zell-Rezeptor-Stimulus T-Lymphozyten APZ abhängig von CpG-DNA kostimuliert werden. Es kommt zu einer Sekretion von Interferon γ durch T-Lymphozyten und NK Zellen, die abhängig ist von den APZ-Produkten IL12 und IFN α und β (Kranzer et al, 2000).

Abbildung 31

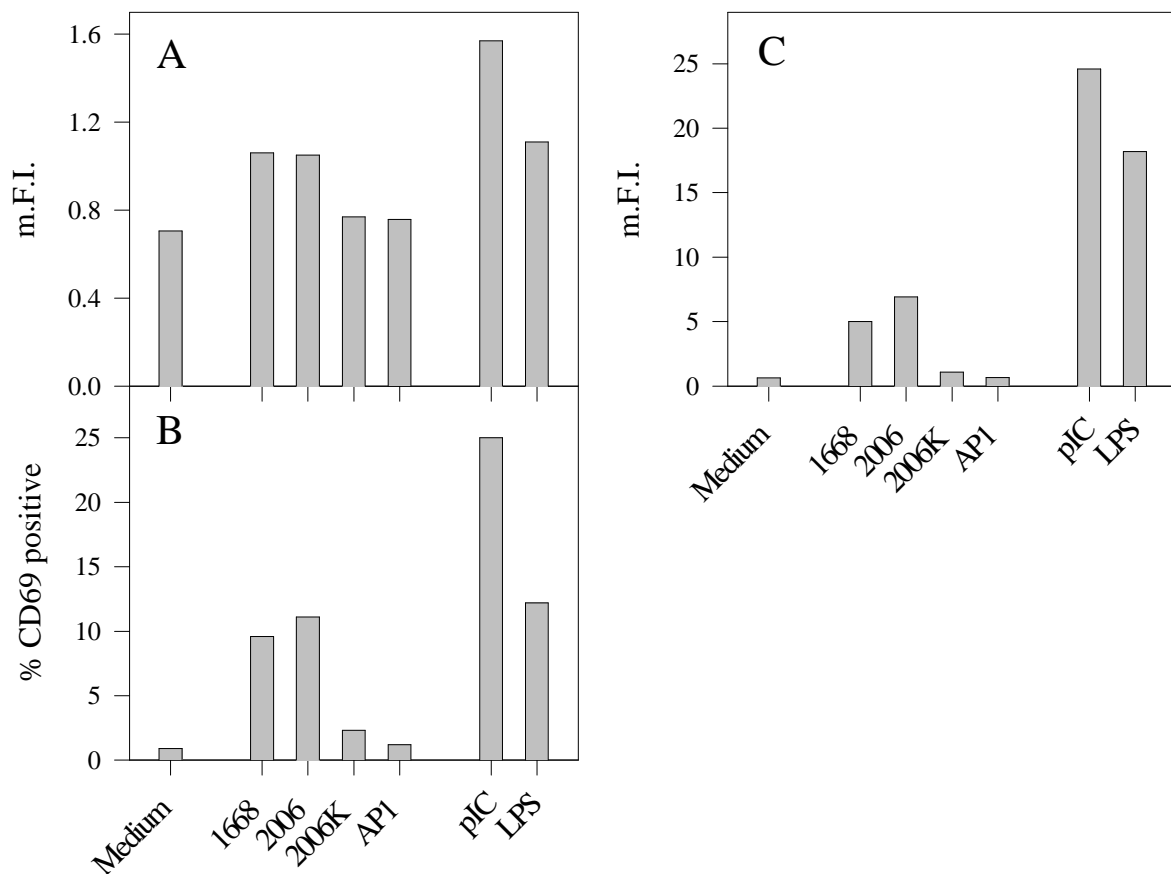


Abbildung 31: Induktion von CD69 auf T-Lymphozyten und NK Zellen in PBMZ

PBMZ (5×10^6 /ml) wurden in 24well-Platten für 24 h mit 2 μ M ODN 1668, 2006, 2006K oder AP, 50 μ g/ml pI:C oder 100 ng/ml LPS inkubiert. Kulturen nur mit Medium dienten als Kontrollen. Anschließend wurden die Zellen mit α CD3 bzw. α CD16 und α CD56 in der Kombination mit α CD69 bzw. entsprechender Isotypkontrolle gefärbt.

(A) zeigt die durchschnittlichen Expressionsintensitäten für CD69 auf den CD3+ Zellen.

(B) zeigt den prozentualen Anteil an CD69+ T-Lymphozyten.

In (C) sind die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten für die CD69-Expression auf den CD16+CD56+ NK Zellen dargestellt.

Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.4.3 Einfluss von CpG-ODN auf T_H1/ T_H2 Ausprägung

Wie bereits erwähnt, können naive CD4 T-Lymphozyten sich zu T_H1 oder T_H2 Zellen entwickeln. Die Zytokine Interleukin 12 und IFN α und β , die von CpG-DNA aktivierten APZ sekretiert werden, unterstützen die Differenzierung zu T_H1 Zellen (Macatonia et al, 1995; Rogge et al, 1998). Diese produzieren IFN γ und führen zur Entwicklung von zellulärer Immunität durch zytotoxische CD8 Zellen. T_H2 Zellen sekretieren auf T-Zell-Rezeptor-Stimulation das Zytokin Interleukin 4, das selbst die Entwicklung zu diesem Phänotyp unterstützt. Neben der Produktion von IL4 durch die T-Zellen ist die Antikörperproduktion des Isotyps IgE für T_H2 Antworten charakteristisch. Ob CpG-Oligonukleotide eine T_H1 Antwort unterstützen können, wurde mit dem in Abb. 32 beschriebenen Ansatz untersucht.

Abbildung 32

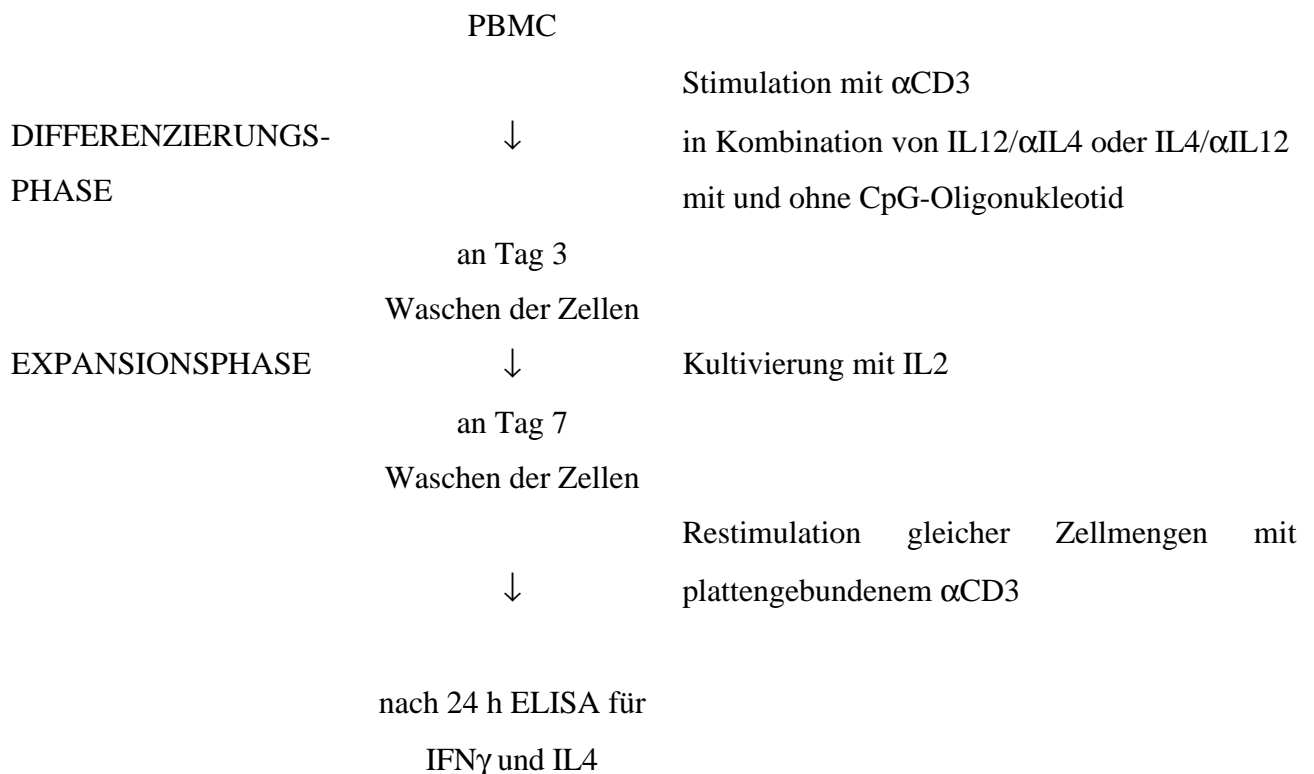


Abbildung 32: Schema zur T_H1/T_H2-Differenzierung

An Tag 7 bestanden die Kulturen zu über 90% aus T-Zellen. Die Zugabe von 2006 während der Differenzierungsphase führte in Kulturen, die nur mit α CD3 stimuliert wurden zu einer Erhöhung der IFN γ Produktion. In einem Ansatz, der durch Zugabe von IL4 und die Blockierung von IL12 die Differenzierung zu T_H2-Zellen favorisiert, kommt es zur Ausschüttung von IL4 nach Restimulation. Durch die Zugabe von ODN 2006 wird die IL4-Produktion reduziert. Die Zugabe von IL12 und die Blockierung von IL4 führen zur Ausbildung eines T_H1-Phänotyps mit Sekretion von IFN γ . Diese kann durch ODN 2006 noch verstärkt werden (Abb. 33).

Die Erhöhung der IFN γ Sekretion und die verminderte Ausschüttung von IL4 stellt jedoch keinen Beweis für eine Differenzierung der T-Zellen dar, da keine naiven T-Zellen für diese Versuche eingesetzt wurden. Es könnte sich ebenso um eine selektive Stimulation der in PBMZ enthaltenen T- Gedächtniszellen handeln.

Abbildung 33

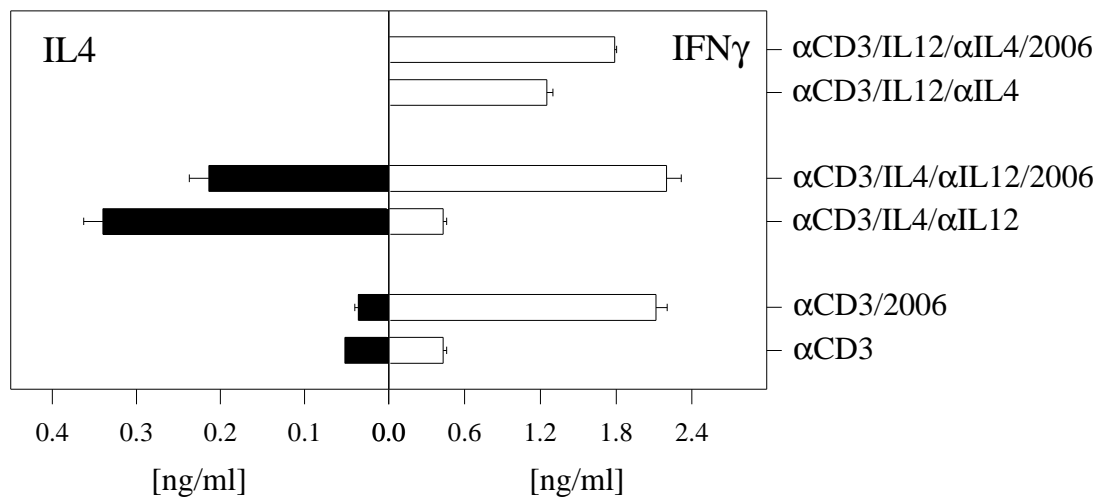


Abbildung 33: Einfluss von CpG-ODN auf die Ausprägung von T_H1/T_H2-Phänotypen in PBMZ
 PBMZ (2×10^6 /ml) wurden nach dem in Abbildung 32 beschriebenen Schema in 24well-Platten kultiviert. Während der Differenzierungsphase wurden 10 ng/ml lösliches α CD3, 10 ng/ml IL4, 2 μ g/ml α IL12 oder 2 ng/ml IL12 und 200 ng/ml α IL4 zugegeben. Die Konzentration an CpG-ODN 2006 war 2 μ M. Für die Expansion der Zellen wurden jeden zweiten Tag 10 U/ml IL2 zugesetzt. Nach der Restimulation von 100×10^3 Zellen/well mit Platten gebundenen α CD3 wurden die Konzentrationen an IFN γ und IL4 bestimmt. Die Daten stellen Durchschnittswerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

4 DISKUSSION

4.1 Das CpG-Motiv und CpG-Oligonukleotide als Modell für bakterielle DNA

Studien in Mäusen haben gezeigt, daß CpG-Oligonukleotide potente Adjuvantien darstellen (Weiner et al, 1997; Moldoveanu et al, 1998; Lipford et al, 1997a; Roman et al, 1997; Chu et al, 1997). So wurde das CpG-Motiv in allgemeiner Form als 5'- Pu-Pu-CG-Py-Py -3' beschrieben. Die höchste Aktivität zeigt 5'-GACGTT-3' wie es sich in dem Oligonukleotid 1668 findet. Ob diese stimulatorische Fähigkeit auch auf Zellen des humanen Immunsystems erweitert werden kann, war zu Beginn dieser Arbeit nicht geklärt.

Frühe Arbeiten von Tokunaga zeigten IFN Typ I-Produktion durch humane PBMZ bei der Verwendung von bakterieller DNA als Stimulus (Tokunaga et al, 1984). Diese Ergebnisse konnten mit Oligonukleotiden reproduziert werden, die palindromische Sequenzen beinhalten (Yamamoto et al, 1992a). Oligonukleotide, die ursprünglich als Antisense-ODN konzipiert waren und CG-Dinukleotide enthielten, zeigten unabhängig von ihrer Antisensewirkung Mitogenität auf humane B-Lymphozyten (Branda et al, 1996; Liang et al, 1996). Auch wenn spekuliert wurde, daß diese Dimere relevant für den Effekt sind, wurde das experimentiell nicht kontrolliert. In anderen Studien wurden Vektoren, die CG-Dimere enthalten, in PBMZ transfiziert und die Produktion von IFN α und IFN γ nachgewiesen (Roman et al, 1996). Die Abhängigkeit von den CG-Dimeren wurde durch Inversion zu GC überprüft, jedoch die Effekte der Transfektion auf die Zytokinausschüttung nicht untersucht.

Durch unsere Arbeiten konnte das erste Mal dargestellt werden, daß CpG-Oligonukleotide ebenso wie bakterielle DNA auf PBMZ und isolierte Zellpopulationen stimulatorisch wirkt (Bauer et al, 1999). Diese Effekte sind auf die enthaltenen CpG-Motive zurückzuführen wie durch Zerstörung der Motive durch Inversion des CG zu GC und somit des Verlusts der Wirkung gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse konnten von mehreren Gruppen bestätigt

werden und CpG-DNA wird heute als etablierter Stimulus für Zellen des humanen Immunsystems angesehen und verwendet (Ballas et al, 1996; Sato et al, 1999; Hartmann et al, 1999; Parronchi et al, 1999).

Die stärksten Effekte konnten mit einem Oligonukleotid erreicht werden, daß von dem in der Maus verwendeten ODN 1668 abweicht. Hingegen sind die in Mausmodellen optimierten CpG-Oligonukleotide auf humanen Zellen nur schwach stimulatorisch. Mit wenigen Ausnahmen zeigt ODN 1668 nur geringes Potential zur Hochregulation von CD86, CD40, MHC Klasse I und Klasse II Molekülen auf B-Lymphozyten oder Monozyten oder zur Freisetzung von Zytokinen aus Monozyten (Tabelle III, Abbildung 11, Tabelle IV). Von Hartmann wird ein Unterschied in der optimalen Sequenz abhängig von der untersuchten Spezies veranschlagt (Hartmann et al, 2000). Durch Vergleich von über 250 Sequenzen konnte er das optimale Motiv für B-Zell-Aktivierung (CD86-Hochregulation) und NK Zell-Stimulation (Zytotoxizität) auf 5'-GTCGTT-3' festlegen. Oligonukleotide mit höchstem Stimulationspotential weisen ein TC am 5'-Ende auf, das CpG-Motiv findet sich mindestens zweimal in dem ODN und wird durch Thymidine voneinander getrennt. Diese Anforderungen erfüllt das ODN 2006 mit der Sequenz 5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3', das in allen unseren Testsystemen das höchste stimulatorische Potential zeigte. In Konsens zu dem von Hartmann vorgeschlagenen Regeln waren nur die beiden zentralen Motive nötig. Die Zerstörung des Motivs am 3'-Ende durch eine Inversion von CG zu GC führte zu keiner Verminderung der Zytokinausschüttung (Abb. 35). Jedoch führte auch die Änderung des 5'-terminalen TC zu TG in unseren Händen zu keiner signifikanten Reduktion der IL6-Produktion, was den Regeln nach Hartmann widerspricht (Daten nicht gezeigt).

Für die Induktion von IFN Typ I in humanen PBMZ wurde von Yamamoto das optimale Motiv als Palindrom 5'-AACGTT-3' angegeben wie es in dem ODN AAC30 vorkommt (Yamamoto et al, 1994). Der Vergleich zwischen den Sequenzen wird jedoch dadurch erschwert, daß Yamamoto nichtmodifizierte Oligonukleotide benutzte. Auch Hartmann räumte in seiner Arbeit ein, daß es Unterschiede in den Anforderungen an Oligonukleotide mit Phosphatbrücken und denen mit Phosphorthioatbrücken geben kann (Hartmann et al, 2000). So ist ein Oligonukleotid mit einem Motiv 5'-GTCGTT-3' und einem 3'-terminalen Bereich aus Cytosinen mit Phosphatbrücken stimulatorisch, mit Phosphorthioatbrücken nicht. Unsere Untersuchungen jedoch zeigten, daß das stabilisierte ODN 2006 zweimal mehr IFN α aus PBMZ freisetzt als das nichtstabilisierte ODN AAC30 (Daten nicht gezeigt).

Ob neben dem stimulatorischen Motiv auch andere Bereiche eines Oligonukleotides Einfluß auf die Aktivität haben können, ist bis jetzt erst wenig untersucht. So konnten in DNA von Adenoviren Serotyp 2 Sequenzen definiert werden, die Wirkung stimulatorischer Motive unterdrücken können (Krieg et al, 1998). Ebenso können Oligonukleotide aus Guanin über den Scavenger-Rezeptor gebunden und internalisiert werden (Kimura et al, 1994). Die Aufnahme in die Zelle ist für die Aktivität des Oligonukleotides essentiell (Hacker et al, 1998; Yi et al, 1998b). Das Anhängen von polyG-Sequenzen an stimulatorische Motive erhöht die Aufnahme der Oligonukleotide in die Zelle, führt aber zu keiner Verstärkung der Effekte der CpG-DNA (Abb. 34 und 35). So zeigt das Oligonukleotid 2006 die höchste Aktivität auf humanen Zellen unabhängig von dem untersuchten Zelltyp oder dem Effekt, der gemessen wird. Dieser Befund läßt auf ein einheitliches Detektionssystem bei allen reagierenden Zellen innerhalb einer Spezies schließen.

Neben der Sicht von CpG-ODN als potentielles Adjuvans in der Vakzinierungstherapie, stellen diese Oligonukleotide ein Modell für immunstimulatorische DNA aus Krankheitserregern dar. Als mit Pathogenen assoziierter Faktor kann die Verwendung von CpG-DNA Aufschluß über die Geschehen während einer Infektion geben. DNA aus *Escherichia coli* ist ein potenter Aktivator von B-Lymphozyten, Monozyten und dendritischen Zellen, DNA aus eukaryotischer Quelle, z.B. Kalbsthymus, jedoch nicht (diese Arbeit). DNA einiger Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren wurden auf ihr immunstimulatorisches Potential getestet (Yamamoto et al, 1992b). Keine DNA eukaryotischen Ursprungs war stimulatorisch, während alle bakteriellen DNA Immunzellen aktivierte. Plasmide, die für bakterielle Produkte kodieren, wie das Ampizillinresistenzgen beinhalten CpG-Motive und sind stimulatorisch (Sato et al, 1996). Ihre Aktivität kann durch Methylierung unterbunden werden. Oligonukleotide wie ACC30 sind aus chromosomaler DNA von *Bacillus Calmette-Guérin* abgeleitet, die NK Zellen stimulieren kann (Yamamoto et al, 1994). Das von uns verwendete, sehr potente DSP30 findet seinen Ursprung in der Sequenz des HIV rev-Gens (Branda et al, 1993).

CpG-Oligonukleotide stellen somit ein Modellreagens für immunstimulatorische prokaryotische DNA dar. Die Einsichten, die die Verwendung dieser Modellagenzien vermittelt, wird sehr eindrucksvoll an den von uns erforschten Effekten auf die lymphoiden CD11c- DZ aufgezeigt. Keiner der Standardstimuli ist in der Lage diese Zellen vollständig zu

aktivieren. CpG-DNA ist der bis heute einzige molekular definierte Faktor, der diesen Zelltyp zu einer kompetenten Antigen präsentierenden Zelle differenziert (Abb. 23 und 24).

4.2 CpG-DNA als Mitogen für B-Lymphozyten

Untersuchungen immunstimulatorischer Effekte von CpG-DNA legen ihren Schwerpunkt auf Antigen präsentierende Zellen und deren Wechselwirkungen mit T-Lymphozyten. Die mitogene Wirkung von CpG-DNA nimmt hierbei eine Außenseiterposition ein. Die Antigen präsentierenden Eigenschaften der B-Lymphozyten sind nur sehr schwach ausgeprägt und ihre Hauptaufgabe liegt in der Produktion von spezifischen Antikörpern.

Der Antikörpersekretion geht eine klonale Expansion der B-Lymphozyten voraus, die über ihre spezifischen B-Zell-Rezeptoren aktiviert wurden. Auf andere Effektorzellen wie z.B. reinen T-Lymphozyten ist CpG-DNA per se nicht stimulatorisch (Sprenst et al, 1998; Kranzer et al, 2000; Iho et al 1999; Bendigs et al, 1999). Hingegen sind Berichte über mitogene Eigenschaften bakterieller DNA und Antisense-Oligonukleotide auf humane Blutzellen schon seit langem bekannt (Messina et al, 1991; Branda et al, 1993). Ebenso war der erste Befund über die immunstimulatorischen Eigenschaften von CpG-Oligonukleotiden die Proliferation induzierende Wirkung auf murine B-Lymphozyten (Krieg et al, 1995). Branda et al definierte eine Sequenz aus der rev Region von HIV. Phosphorthioat-modifizierte Oligonukleotide mit dieser Sequenz waren in der Lage Proliferation in humanen B-Lymphozyten zu induzieren (Branda et al, 1996). Liang et al nahmen die Sequenz in ihre Arbeiten auf und zeigten die Induktion von Proliferation, Hochregulation von Aktivierungsantigenen und Immunglobulinsekretion (Liang et al, 1996). Jedoch wurden in diesen Arbeiten die immunstimulatorischen Eigenschaften der Oligonukleotide nicht in Verbindung mit enthaltenen CpG-Motiven gebracht.

Von uns konnte gezeigt werden, daß bakterielle DNA und CpG-ODN in humanen Blutzellen Proliferation induzieren (Abbildung 2 und 3). Die proliferierenden Zellen konnten als B-Zellen definiert werden (Abbildung 4 und Text). Die Aktivierung der B-Zellen ist polyklonal und nicht abhängig von weiteren Faktoren, da auch auf reinen B-Lymphozyten CpG abhängig

Zellvermehrung induziert wird (Abbildung 5 und 6). Die Induktion von Proliferation korreliert mit der Konzentration der Oligonukleotide und der Anwesenheit von CpG-Motiven. Jedoch waren auch GpC-Kontrolloligonukleotide schwach stimulatorisch.

Neue Arbeiten beschäftigten sich mit der Signaltransduktion von CpG-DNA auf humanen B-Lymphozyten (Hartmann et al, 2000). Vergleichbar zu B-Zellen der Maus konnte gezeigt werden, daß die Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP1 beteiligt sind. Im Zuge der Signalweiterleitung werden die Kinasen JNK und p38-MAPK phosphoryliert. Ein früher Schritt der Aktivierung durch CpG-DNA ist die Aufnahme der DNA in saure endosomal/lysosomale Kompartimente (Hacker et al, 1998).

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß die diprotische Base Chloroquin, die die Reifung der Endosomen verhindert, die Induktion der Proliferation unterbinden kann (Abbildung 32).

Faktoren, die von aktivierten T-Lymphozyten zur Verfügung gestellt werden können, wie IL2 oder CD40-Ligation sind in der Lage die Effekte der CpG-DNA zu verstärken (Liang et al, 1996; Decker et al, 2000). Ebenso kann IFN Typ I, ein Produkt von lymphoiden CD11c-dendritischen Zellen auf Stimulation mit CpG-DNA, die Proliferation der B-Lymphozyten verstärken (Abbildung 26A). Die in PBMZ zu beobachtende Proliferation von B-Lymphozyten ist somit auf eine synergistische Wirkung von direkt CpG-DNA induzierter Proliferation und durch CpG-DNA induzierte IFN Typ I-Produktion aus lymphoiden CD11c-DZ zurückzuführen (Abbildung 26B).

Die Bedeutung der polyklonalen Aktivierung von B-Lymphozyten durch CpG-DNA und ihre Auswirkung auf das Immunsystem ist bis heute noch unklar und wird kontrovers diskutiert. Die erhöhte Produktion von polyklonalen Antikörpern könnte eine bessere Opsonisierung von Pathogenen zur Folge haben und somit die Aufnahme der Keime in APZ unterstützen.

LPS wurde früher als ein „Thymus unabhängiges Antigen“ (TI-1-Antigen) für murine B-Lymphozyten bezeichnet und führt in hohen Konzentrationen zu polyklonaler Expansion. Bei hoher „TI-1-Antigen“-Konzentration erfolgt die Proliferation also ohne spezifischer Stimulation des B-Zell-Rezeptors und wirkt auf alle B-Lymphozyten (Snapper et al, 1996). CpG-DNA verhält sich im Sinne der Proliferation (eigene Daten) und der Antikörperproduktion (Liang et al, 1996) wie ein „TI-1-Antigen“ in hoher Konzentration. Die

Stimulation mit CpG-DNA wirkt synergistisch mit einem B-Zell-Rezeptor-Signal (Krieg et al, 1995). Kreuzvernetzung des B-Zell-Rezeptors durch CpG-DNA plus die direkte Aktivierung durch die immunstimulatorische Wirkung könnte zur Sekretion DNA spezifischer Antikörper führen. Hinweise auf die immunologische Relevanz solcher Antikörper findet man in folgenden Befunden. Untersuchungen von humanen Sera zeigten spezifische Bindung zu DNA von z.B. *Micrococcus lysodieticus*, *Staphylococcus epidermidis* und BK polyomavirus (Fredriksen et al, 1993; Pisetsky et al, 1998). In Sera von Systemischer Lupus Erythematosus (SLE)-Patienten finden sich Komplexe aus DNA und anti-DNA-Antikörpern. Die DNA in diesen Komplexen weist eine hohe Frequenz an CG-Dinukleotiden auf (Sano et al, 1989). Künstlich hergestellte Komplexe aus immunstimulatorischer DNA und Antikörpern gegen doppelsträngige DNA mimikrieren das IFN α -induzierende Agens, die man in Sera von SLE-Patienten findet (Vallin et al, 1999).

4.3 Die Zielzellen für CpG-DNA sind Antigen präsentierende Zellen

Das Immunsystem birgt eine Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen, die sich durch spezielle Fähigkeiten auszeichnen. Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, auf CpG-DNA reagierende Zellpopulationen zu definieren. Von unterschiedlichen Zelltypen, die getestet wurden, zeigten nur Zellen, die zur Gruppe der Antigen präsentierenden Zellen (APZ) zusammen gefaßt werden können, Responsivität gegen CpG-DNA. Zu ihnen zählt man B-Lymphozyten, Monozyten des Bluts bzw. gewebständige Makrophagen und dendritische Zellen.

4.3.1 Induktion von Antigen präsentierenden und kostimulatorischen Oberflächenmolekülen

Antigen präsentierende Moleküle wie MHC Klasse I und II und kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 sind für die Aktivierung von T-Lymphozyten von eminenter Bedeutung. Über die MHC-Komplexe liefert die APZ ein Signal an die T-Zelle, die diese mit ihren spezifischen T-Zell-Rezeptoren erkennt. Ein zweites Signal wird für den T-Lymphozyt über die Interaktion von CD80 und CD86 mit CD28 bereitgestellt. Nur die Kombination beider Signale führt zu einer produktiven Antwort des T-Lymphozyt. CD80 und CD86 wird von ruhenden APZ nicht exprimiert und die Anzahl der Moleküle stellt somit ein Maß für den Aktivierungsstatus der Zelle dar (Slavik et al, 1999). CD40, ein weiteres Antigen auf der Oberfläche von APZ, stellt einen wichtigen Pfad für die Aktivierung der APZ dar. Seine Expression ist ebenfalls von dem Status der Zelle abhängig (van Kooten et al, 2000).

Auf dendritischen Zellen der Maus, die aus Knochenmark kultiviert oder aus der Haut isoliert wurden, konnte durch Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden eine Hochregulation von MHC Klasse II sowie kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 und CD40 gezeigt werden (Sparwasser et al, 1998; Jakob et al, 1998).

Informationen über den Effekt von CpG-DNA auf die Oberflächenantigenexpression humaner Zellen sind bisher gering. Auf B-Lymphozyten wurde die Hochregulation von CD86 durch ein Oligonukleotid gezeigt (Liang et al, 1996). Die Abhängigkeit von enthaltenen CpG-Motiven wurde jedoch nicht untersucht. Neuere Daten wurden mit einer CD4⁺ CD3⁻ CD14⁻ CD19⁻ CD16⁻ CD56⁻ Population aus dem Blut gewonnen (Hartmann et al, 1999). Die so isolierte Population stellt ein Gemisch aus unterschiedlichen Zelltypen dar. Auf einer Subpopulation dieser dendritischer Zellen konnte die CpG spezifische Hochregulation von CD86 und MHC Klasse II, evtl. auch CD40 gezeigt werden. Die reagierenden Zellen wurden allerdings nicht genauer charakterisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß B-Lymphozyten, Monozyten und lymphoide CD11c⁻ dendritische Zellen auf die Stimulation mit CpG-DNA mit erhöhter Expression von CD86, CD40, MHC Klasse I und II reagieren. Dieser Effekt ist abhängig von den enthaltenen CpG-Motiven, da die Inversion der CG zu GC den Effekt stark vermindert

bzw. vollständig aufhebt. Dieselbe Aktivierung lässt sich mit bakterieller DNA induzieren, während eukaroytische DNA zu keiner Stimulation der Zellen führt (Tabelle III, Tabelle IV, Abb. 23). B-Lymphozyten reagierten auf CpG-DNA unspezifischer als Monozyten oder lymphoide CD11c- DZ. Erklärt könnte diese Beobachtung durch die nichtspezifischen Effekte der Phosphorthioatmodifikation der ODN werden (Liang et al, 1996). Alternativ dazu könnten B-Lymphozyten responsiver gegenüber Signalen des postulierten DNA-Rezeptors an der Oberfläche der Zellen sein, der weniger CpG-Abhängigkeit zeigt (Hacker et al, 1998).

Monozyten und lymphoide CD11c- DZ werden durch die Stimulation mit CpG-DNA ideal ausgerüstet, um mit naiven T-Lymphozyten zu interagieren und diese über MHC-Peptid-Komplexe und kostimulatorische Moleküle wie CD86 zu aktivieren. Die Interaktion zwischen der aktivierten Antigen präsentierenden Zelle und dem naiven T-Helfer-Lymphozyten ist dualistisch. Eine schnelle, aber transiente Antwort der naiven CD4+ T-Zellen auf die Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor ist die Expression von CD40L (Jaiswal et al, 1996). Durch die DNA induzierte Hochregulation von CD40 auf der APZ ist diese suszeptibel für dieses Signal. Eine über CD40 aktivierte APZ ist in der Lage zytotoxische T-Lymphozyten zu aktivieren (Cella et al, 1996; Ridge et al, 1998). Ob und wie die Signale von CpG-DNA und CD40-Ligation in der APZ integriert werden, ist bis heute noch unbeantwortet und bedarf der Klärung. So konnten in Mäusen, die keinen CD40L exprimieren, durch Vakzinierung mit Peptiden plus CpG-DNA spezifische zytotoxische T-Lymphozyten induziert werden (Vabulas et al, 2000).

4.3.2 CpG-DNA induzierte Zytokinsekretion

Neben der Expression membrangebundener stimulatorischer Moleküle sind Antigen präsentierende Zellen in der Lage Zytokine als lösliche Mediatoren zu sezernieren. So konnten durch CpG-DNA Monozyten zur Sekretion von Interleukin 6 und Interleukin 12 angeregt werden (Abb. 11). EC DNA war in der Lage TNF zu induzieren. Lymphoide CD11c- dendritische Zellen setzen nach Stimulation mit CpG-DNA TNF, IFN α , GM-CSF und Interleukin 8 frei (Abbildung 24). Diese Freisetzung an Zytokinen ist CpG abhängig und kann ebenfalls mit bakterieller DNA erreicht werden.

TNF und IL6 werden zu den sogenannten proinflammatorischen Zytokinen gezählt.

Die Wirkung von TNF auf die vaskulären Endothelzellen der Blutgefäße erleichtert den Übertritt von Monozyten und Lymphozyten in das Gewebe (McEver et al, 1995). Weiterhin aktiviert es Neutrophile und Eosinophile Mikroben abzutöten und wirkt systemisch als endogenes Pyrogen. So konnte in Mäusen die Induktion lokaler und systemischer Inflammation durch CpG-DNA auf produziertes TNF zurückgeführt werden (Sparwasser et al, 1997a; Sparwasser et al, 1997b; Halpern et al, 1996; Schwartz et al, 1997).

Interleukin 6 führt zur Ausschüttung von akute Phase-Proteinen und ist bedeutend für die Abwehr von Infektionen (Akira et al, 1996). Für aktivierte B-Zellen ist IL6 Wachstumsfaktor und führt zu Antikörpersezerernierung. So konnte gezeigt werden, daß die CpG-DNA induzierte IL6-Produktion für die Sekretion von IgM notwendig ist (Klinman et al, 1996; Yi et al, 1996b). Vor allem TNF aber auch IL6 stellen einen Maturierungsfaktor für dendritische Zellen dar (Sallusto et al, 1995; Drakesmith et al, 1998; Jonuleit et al; 1997).

IL12 hat sowohl Effekte auf die angeborene wie auch auf die adaptive Immunität. Neben der Aktivierung von NK Zellen ist die wichtigste Eigenschaft die Differenzierung naiver T-Helfer-Zellen (T_{H0}) zu T_{H1} (Macatonia et al, 1995). IL12 induziert hierbei die Produktion von $IFN\gamma$ durch die T_{H1} -Zellen (Trinchieri et al, 1998). Neben den Wirkungen auf die Effektorzellen T-Lymphozyten und NK Zellen hat IL12 auch Einfluß auf Antigen präsentierende Zellen (Grohmann et al, 1997; Fukao et al, 2000). Die Behandlung von APZ mit IL12 ermöglichte effektive Präsentation von einem viralen Antigen.

IL8 ist als C-X-C Chemokin in der Lage Leukozyten zum Inflammationsherd zu rekrutieren und agiert hierfür in Koordination mit TNF (McEver et al, 1995).

GM-CSF hat als hämatopoetischer Wachstumsfaktor eine entscheidende Bedeutung in der Bereitstellung von Leukozyten (Metcalf et al, 1986). Eine Korrelation zwischen der CpG-DNA induzierten extramedullären Hämatopoese und Faktoren wie GM-CSF wurde diskutiert (Sparwasser et al, 1999). In der Kombination mit IL4 stellt GM-CSF ein Differenzierungssignal für Monozyten zu dendritischen Zellen dar (Sallusto et al, 1995).

$IFN\alpha$ stellt eine Gruppe aus 12 unterschiedlichen Genprodukten dar, die alle an den selben Rezeptor binden (Herberman et al, 1997). $IFN\alpha$ inhibiert virale Replikation (Pestka et al, 1987), aktiviert NK Zellen (Ortaldo et al, 1984) und führt zur Hochregulation von MHC Klasse I (Boehm et al, 1997). Die Effekte auf Zellen des adaptiven Immunsystems sind die Verstärkung B-Zell-Rezeptor induzierter Proliferation (Hibbert et al, 1999) sowie die

Differenzierung naiver T-Helfer-Zellen (T_H0) zu T_H1 (Rogge et al, 1998). So konnte die Abhängigkeit der Aktivierung muriner T-Lymphozyten von IFN Typ I gezeigt werden (Sprent et al, 1998). Weiterhin verstärkt es die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Taylor et al, 1998).

Auswirkungen der CpG-DNA induzierten Zytokinproduktion auf humane Zellen in komplexen Zellgemischen wie Blut sind bis heute größtenteils spekulativ. Das von lymphoiden CD11c- DZ freigesetzte IFN α wirkt verstärkend auf die CpG-DNA induzierte Proliferation der B-Zellen wie Blockadeexperimente mit Blutzellen und der Zusatz von IFN α bzw. lymphoiden CD11c- DZ zu hochreinen B-Lymphozyten zeigen (Abbildung 26).

Ebenso konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung von T-Lymphozyten und NK Zellen im PBMZ von der CpG-induzierten Freisetzung von IL12 und IFN α abhängig ist (Kranzer et al, 2000). Diese beiden Zytokine haben das Potential zur T_H1 -Differenzierung.

In Vorversuchen mit PBMZ konnten einem Differenzierungsprotokoll folgend durch CpG-ODN 2006 T-Zellen zur Produktion von IFN γ angeregt werden (Abbildung 30). Die Idee, daß CpG-Oligonukleotide zur Induktion von T_H1 und sogar zu einer Reversion einer bereits etablierten T_H2 Antwort auf humanen Zellen in der Lage sind, wird durch eine Publikation von Parronchi et al unterstützt (Parronchi et al, 1999). Sie konnten zeigen, daß Allergen spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten durch die Zugabe von CpG-DNA zu in vitro Kulturen von einem IL4 produzierenden T_H2 -Phänotyp in T_H1 Zellen revertiert werden können, die IFN γ sekretieren. Diese Veränderung des Zytokinprofils war abhängig von den Zytokinen IL12, IFN α und IFN γ .

4.4 Lymphoide CD11c- dendritische Zellen als Zielzellen für Pathogen assoziierte molekulare Muster

Über Pathogen assoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular pattern = PAMP) können Antigen präsentierende Zellen eindringende Keime detektieren. Durch die Bindung des PAMP an den entsprechenden Muster erkennenden Rezeptor (pattern recognition receptor = PRR) werden die APZ aktiviert. Prominente PAMP sind Lipopolysaccharid aus der Zellwand gram-negativer Bakterien (Pugin et al, 1994), sowie poly-Inosin : poly-Cytidyl-Säure (pI:C) als Modell für virale doppelsträngige RNA (Chu et al, 1999).

CpG-DNA teilt mit LPS und pI:C einige Eigenschaften wie die Aktivierung von Monozyten (Tabelle IV). Dennoch zeigen sich auf den lymphoiden CD11c- DZ grafierende Unterschiede. CpG-DNA wirkt auf diese Zellen antiapoptotisch auf das spontane, sowie das Interleukin 4 induzierte Zellsterben. Weder LPS noch pI:C zeigen diesen Effekt (Abbildung 19 und 20).

CpG-DNA induziert auf lymphoiden CD11c- DZ die Hochregulation von CD86, CD40, MHC Klasse I und Klasse II, sowie die Ausschüttung von TNF, IL8, GM-CSF und IFN α und führt zu morphologischen Veränderungen der Zellen. Selbst im Kontext mit IL3 als Überlebensfaktor sind LPS und pI:C nicht in der Lage, die Zellen in diesem Umfang zu aktivieren (Abbildung 22, 23 und 24). Eine Ausnahme stellt die Produktion von IFN α durch pI:C dar. Während lymphoide CD11c- DZ durch CpG-DNA vollständig aktiviert werden, führt pI:C nur zur Freisetzung von IFN α und induziert somit eine limitierte Antwort des angeborenen Immunsystems (Abbildung 24).

Die Ligation von CD40 simuliert die Interaktion mit aktivierten T-Lymphozyten und ist bekannt als starker Stimulus für lymphoide CD11c- DZ. Sie führt zu Maturierung der Zellen, gezeigt an der Hochregulation der Oberflächenmarker (Abbildung 23). Jedoch läßt sich nur die Ausschüttung von IL8 feststellen und die antiapoptotische Aktivität ist gering (Abbildung 19, 20 und 24).

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse, daß lymphoide CD11c- DZ analog zu myeloiden DZ als „Wächter“ des Immunsystems ihre Umgebung wahrnehmen. Auf den passenden Stimulus reagieren sie mit einem breiten Spektrum an Reaktionen und konvertieren zu Effektor-DZ. Diese Arbeit definiert den bisher einzigen molekular definierten Stimulus für lymphoide CD11c- DZ, der Bestandteil von Pathogenen ist. Im Gegensatz zu CpG-DNA hatten weder LPS noch pI:C das Potential sie in vergleichbarer Weise zu aktivieren. Die schnelle und vollständige Aktivierung der Zellen durch CpG-DNA legt nahe, daß lymphoide CD11c- DZ nicht nur ein Zwischenstadium in der Entwicklung weiter differenzierter DZ sind oder nicht nur verantwortlich für periphere T-Zell-Toleranz sind (Res et al, 1999; Banchereau et al, 1998).

Über die Signaltransduktion von CpG-DNA in humanen Immunzellen konnte für humane B-Lymphozyten gezeigt werden, daß die Transkriptionsfaktoren NFκB und AP1 beteiligt sind. In der Aktivierung von AP1 sind die Kinasen JNK und p38-MAPK involviert (Hartmann et al, 2000).

Unter Verwendung von Makrophagen bzw. dendritischen Zellen der Maus konnte die Aktivierung des NFκB-Signaltransduktionswegs und des MAPK-Wegs über JNKK1, JNK und p38-MAPK beschrieben werden (Sparwasser et al, 1997b; Yi et al, 1998c; Hacker et al, 1998; Hacker et al, 1999). Als Vorgänge an der Cytoplasmamembran werden die Bindung an einen CpG unspezifischen Rezeptor postuliert. Anschließend folgt die Aufnahme in endosomale Kompartimente, deren Azidifizierung essentiell für die Aktivität der CpG-DNA ist (Hacker et al, 1998; Macfarlane et al, 1998; Krieg et al, 1998; Abbildung 7 und 18). Zusammenfassend sind die bisher beschriebenen Komponenten in Abbildung 1 dargestellt. Ebenso konnte die Beteiligung von MyD88 und TRAF6 im NFκB-Weg gezeigt werden (Hacker, unveröffentlichte Ergebnisse).

LPS nutzt für die Aktivierung von NFκB einen Weg über TLR, MyD88, TRAF6, NIK und IKK (Regnier et al, 1997; DiDonato et al, 1997; Kirschning et al, 1998; Yang et al, 1998). Ebenso wird über den MAPK-Weg JNK und p38-MAPK aktiviert und somit AP1 phosphoryliert (Hambleton et al, 1996).

pI:C nutzt zumindest partiell ähnliche Signalwege. So führt es zu Phosphorylierung von AP1 über die Kinasen JNKK und JNK2 und Aktivierung von NFκB über PKR und IKK (Chu et al, 1999).

Die Parallelität der Signaltransduktion dieser drei PAMP und die unterschiedlichen Antworten der lymphoiden CD11c- DZ läßt vermuten, daß die Abweichungen in membrannahen Komponenten der Signalweiterleitung zu suchen sind. So könnten sie erklärt werden über das Vorhandensein des Rezeptor für CpG-DNA und das Fehlen des LPS-Rezeptorsystems. Die Zelle stellt somit ein ideales Objekt dar für die Untersuchung entsprechender Kandidaten z.B. Mitgliedern der Toll-ähnlichen Rezeptorfamilie.

Im Gegensatz zu myeloiden DZ sind lymphoide CD11c- DZ nicht in der Lage auf die getesteten Stimuli IL12 zu produzieren (Daten nicht gezeigt). Jedoch sekretieren sie nach CpG-DNA-Stimulation $\text{IFN}\alpha$, das neben IL12 auf humanen T-Zellen die Differenzierung zu $\text{T}_{\text{H}1}$ fördert (Rogge et al, 1998). In PBMZ wird IL12 von Monozyten als Antwort auf CpG-DNA freigesetzt. In Berichten, die zeigten, daß lymphoide CD11c- DZ $\text{T}_{\text{H}2}$ -Antworten induzieren, wurde als Aktivierungsstimulus CD40-Ligation verwendet, was nicht zu der Ausschüttung von $\text{T}_{\text{H}1}$ unterstützendem $\text{IFN}\alpha$ führt (Rissoan et al, 1999). Die Klassifizierung von lymphoiden CD11c- DZ als $\text{T}_{\text{H}2}$ polarisierende dendritische Zelle wird auch durch den Befund in Frage gestellt, daß eine $\text{ILT3}^+ \text{ILT1}^- \text{CD4}^+ \text{CD123}^+ \text{CD11c}^-$ DZ aus dem Blut zu einer nichtpolarisierten T-Zell-Differenzierung führte (Cella et al, 1999). Das T-Zell-Differenzierungspotential der lymphoiden CD11c- DZ nach Stimulation mit CpG-DNA bedarf der weiteren Analyse und stellt eine interessante Fragestellung der CpG-DNA-Immunologie mit humanen Zellen dar.

4.5 Lymphoide CD11c- DZ im Vergleich zu myeloiden DZ

In den letzten Jahren hat sich das Konzept entwickelt, daß Infektionen durch PRR detektiert werden. Dieser Vorgang führt zu einer T-Lymphozyten unabhängigen Aktivierung unreifer dendritischer Zellen zu professionellen Antigen präsentierenden Zellen. Die Idee, daß DZ die Differenzierung von T-Zellen zu $\text{T}_{\text{H}1}$ oder $\text{T}_{\text{H}2}$ dirigieren wurde bisher nur im Kontext unterschiedlicher DZ-Linien wie myeloid gegenüber lymphoid untersucht und diskutiert. Der

Vergleich unterschiedlicher Stimuli auf einen Typ von dendritischer Zellen oder die Auswirkungen eines Stimulus auf unterschiedliche DZ-Populationen wurden bisher noch nicht berücksichtigt.

Während die lymphoiden CD11c- DZ mit einem breiten Spektrum von Antworten auf CpG-DNA reagieren, werden sie durch LPS und pI:C nicht zu professionellen APZ aktiviert (Abb. 23 und 24). Im Gegensatz dazu werden DZ, die aus Monozyten differenziert werden, durch LPS und pI:C vollständig aktiviert, reagieren aber auf die Gabe von CpG-DNA nicht (Tabelle VI). Die Diversität der durch das Immunsystem generierten dendritischen Zellen muß sich nicht zwangsläufig auf die Tatsache gründen, APZ mit unterschiedlichem Antwortpotential bereitzustellen, die von einander abweichende adaptive Immunantworten generieren z.B. T_H1, T_H2 oder Toleranz. Vielmehr kann die Diversität das Immunsystem dazu befähigen auf verschiedene Komponenten von Pathogenen mit ähnlich gearteten Antworten zu reagieren, was das Spektrum der detektierbaren Keime erweitert.

In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, daß CpG-DNA immunstimulatorisch auf humane Zellen wirkt. Als Modell für bakterielle DNA konnten synthetisch hergestellte Oligonukleotide verwendet werden. Zielzellen für CpG-DNA sind Antigen präsentierende Zellen. CpG-DNA zeigt auf diesen Zellen Wirkungen wie andere Komponenten bakteriellen Ursprungs zum Beispiel Lipopolysaccharid. Beide Stimuli differieren jedoch sowohl im Spektrum der induzierten Effekte als auch der Zielzellen.

Während CpG-DNA B-Zellproliferation induziert, ist LPS dazu nicht in der Lage.

LPS stimuliert Zellen der myeloiden Entwicklungslinie wie Monozyten und myeloide dendritische Zellen zur Hochregulation von Oberflächenantigenen, die für APZ- T-Zell-Interaktionen von Bedeutung sind. Analog dazu setzt es aus den Zellen proinflammatorische und Effektorzytokine frei. Von besonderem Interesse ist hierbei Interleukin 12 aufgrund seines Potentials T-Helfer-Zellen zu differenzieren. LPS ist nicht in der Lage lymphoide CD11- DZ zu aktivieren.

CpG-DNA hat das Potential Monozyten zu aktivieren. Die Zytokininduktion auf diesen Zellen ist im Vergleich zu LPS jedoch gering. Im Gegensatz zu LPS wirkt es als sehr potenter Stimulus für lymphoide dendritische Zellen und generiert auf ihnen Antworten, die mit denen von LPS auf myeloiden DZ vergleichbar sind. Eine Ausnahme stellt die Induktion von IL12 dar. Lymphoide CD11c- DZ sind auf keinen der getesteten Stimuli in der Lage IL12 zu

produzieren. Jedoch sekretieren sie nach Aktivierung durch CpG-DNA $\text{IFN}\alpha$, das wie IL12 humane T-Helfer-Zellen zu einem $\text{T}_{\text{H}1}$ -Phänotyp differenzieren kann.

Große Hoffnungen werden in CpG-DNA als Modell für immunstimulatorische Komponenten bakterieller Infektionen gelegt. Die in diesem Modellsystem gewonnenen Erkenntnisse können neue Behandlungsansätze schwer einzudämmender Krankheiten liefern.

CpG-Oligonukleotide könnten als Adjuvans für Impfprotokolle humaner Individuen das Spektrum der Präventivmedizin erweitern. Ein erster Schritt ist mit dem Nachweis der Aktivierung humaner Antigen präsentierender Zellen durch CpG-DNA in dieser Arbeit geleistet.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden Immunreaktionen humaner Zellen auf stimulatorische DNA beschrieben. Als immunstimulatorische DNA benutzten wir prokaryotische DNA von *Escherichia coli* und stabilisierte synthetische Oligonukleotide, die die entsprechenden CpG-Motive enthalten. Neben der Evaluierung von Antworten in Zellgemischen wurden die direkten Effekte der DNA auf isolierte Zellpopulationen charakterisiert. Die Abhängigkeit der Aktivität von den enthaltenen CpG-Motiven wurde überprüft.

PBMZ wurden durch bakterielle DNA und CpG-Oligonukleotide zur Proliferation und zur Sekretion der Zytokine IL12 und IL6 angeregt. Die Proliferation konnte auf B-Lymphozyten zurückgeführt werden, die Zytokinausschüttung auf Monozyten. Analog zeigten hochreine B-Lymphozyten ebenfalls Proliferation bzw. Monozyten Zytokinsekretion, was auf eine direkte Wirkung der CpG-DNA auf die Zellen schließen läßt. Zusätzlich konnte auf beiden Populationen die CpG-DNA induzierte Hochregulation der Antigen präsentierenden Moleküle HLA-A, -B, -C und HLA-DR sowie der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD86 und CD40 dargestellt werden. In PBMZ konnte ferner die Aktivierung von lymphoiden CD11c-dendritischen Zellen durch CpG-DNA nachgewiesen werden. Reine lymphoide CD11c- DZ wurden durch CpG-DNA von der spontanen und Interleukin 4 induzierten Apoptose bewahrt, regulierten die Oberflächenmoleküle HLA-A, -B, -C, HLA-DR, CD86 und CD40 hoch und sekretierten die Zytokine TNF, GM-CSF, IL8 und IFN α . Alle Reaktionen der untersuchten Zellpopulationen waren DNA bzw. CpG-Motiv abhängig, da verdaute EC DNA oder eukaryotische DNA bzw. Phosphorothioat modifizierte ODN mit invertierten CG zu GC geringes bis kein Stimulationspotential besaßen. Im Gegensatz dazu reagierten die aus Monozyten differenzierten myeloiden DZ nicht auf CpG-DNA, jedoch auf Lipopolysaccharid (LPS) und poly-Inosin : poly-Cytidyl-Säure (pI:C). Weder LPS noch pI:C waren in der Lage lymphoide CD11c- DZ vollständig zu aktivieren.

Während T-Zellen und NK Zellen nicht direkt durch CpG-DNA stimuliert werden, konnten sie in Zellgemischen wie PBMZ durch CpG-DNA induzierte Mediatoren wie IL12 und IFN α indirekt aktiviert werden. Auch auf die B-Zell-Proliferation hat CpG-DNA induziertes IFN α synergistische Wirkung.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Aderem, A. and Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.* **17**, 593-623.

Akira, S. and Kishimoto, T. (1996) Role of interleukin-6 in macrophage function. *Curr.Opin.Hematol.* **3**, 87-93.

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**, 1840-1845.

Banchereau, J. and Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.

Bauer, M., Heeg, K., Wagner, H. and Lipford, G.B. (1999) DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner. *Immunology* **97**, 699-705.

Bird, A.P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209-213.

Bird, T.A., Kyriakis, J.M., Tyshler, L., Gayle, M., Milne, A. and Virca, G.D. (1994) Interleukin-1 activates p54 mitogen-activated protein (MAP) kinase/stress-activated protein kinase by a pathway that is independent of p21ras, Raf-1, and MAP kinase kinase. *J.Biol.Chem.* **269**, 31836-31844.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. and Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu.Rev.Immunol.* **15**, 749-795.

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**, 2344-2353.

Branda, R.F., Moore, A.L., Hong, R., McCormack, J.J., Zon, G. and Cunningham-Rundles, C. (1996) B-cell proliferation and differentiation in common variable immunodeficiency patients produced by an antisense oligomer to the rev gene of HIV-1. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **79**, 115-121.

Branda, R.F., Moore, A.L., Mathews, L., McCormack, J.J. and Zon, G. (1993) Immune stimulation by an antisense oligomer complementary to the rev gene of HIV-1. *Biochem.Pharmacol.* **45**, 2037-2043.

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**, 919-923.

Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. and Alber, G. (1996) Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J.Exp.Med.* **184**, 747-752.

Chen, B., Shi, Y., Smith, J.D., Choi, D., Geiger, J.D. and Mule, J.J. (1998) The role of tumor necrosis factor alpha in modulating the quantity of peripheral blood-derived, cytokine-driven human dendritic cells and its role in enhancing the quality of dendritic cell function in presenting soluble antigens to CD4+ T cells in vitro. *Blood* **91**, 4652-4661.

Chesnut, R.W., Colon, S.M. and Grey, H.M. (1982) Antigen presentation by normal B cells, B cell tumors, and macrophages: functional and biochemical comparison. *J.Immunol.* **128**, 1764-1768.

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**, 1623-1631.

Chu, W.M., Ostertag, D., Li, Z.W., Chang, L., Chen, Y., Hu, Y., Williams, B., Perrault, J. and Karin, M. (1999) JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity.* **11**, 721-731.

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**, 4570-4575.

Cumberbatch, M., Gould, S.J., Peters, S.W. and Kimber, I. (1991) MHC class II expression by Langerhans' cells and lymph node dendritic cells: possible evidence for maturation of Langerhans' cells following contact sensitization. *Immunology* **74**, 414-419.

Davis, H.L., Weeranta, R., Waldschmidt, T.J., Tygrett, L., Schorr, J. and Krieg, A.M. (1998) CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J.Immunol.* **160**, 870-876.

Decker, T., Schneller, F., Sparwasser, T., Tretter, T., Lipford, G.B., Wagner, H. and Peschel, C. (2000) Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* **95**, 999-1006.

DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. and Karin, M. (1997) A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* **388**, 548-554.

Drakesmith, H., O'Neil, D., Schneider, S.C., Binks, M., Medd, P., Sercarz, E., Beverley, P. and Chain, B. (1998) In vivo priming of T cells against cryptic determinants by dendritic cells exposed to interleukin 6 and native antigen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 14903-14908.

Emlen, W., Pisetsky, D.S. and Taylor, R.P. (1986) Antibodies to DNA. A perspective. *Arthritis Rheum.* **29**, 1417-1426.

Evans, D.E., Munks, M.W., Purkerson, J.M. and Parker, D.C. (2000) Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/CD40. *J.Immunol.* **164**, 688-697.

Fearon, D.T. and Locksley, R.M. (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**, 50-53.

- Fitzgerald-Bocarsly, P. (1993) Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol.Ther.* **60**, 39-62.
- Fredriksen, K., Skogsholm, A., Flaegstad, T., Traavik, T. and Rekvig, O.P. (1993) Antibodies to dsDNA are produced during primary BK virus infection in man, indicating that anti-dsDNA antibodies may be related to virus replication in vivo. *Scand.J.Immunol.* **38**, 401-406.
- Fukao, T., Matsuda, S. and Koyasu, S. (2000) Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J.Immunol.* **164**, 64-71.
- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* **16**, 225-260.
- Grilli, M., Chiu, J.J. and Lenardo, M.J. (1993) NF-kappa B and Rel: participants in a multifunctional transcriptional regulatory system. *Int.Rev.Cytol.* **143**, 1-62.
- Grohmann, U., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Vacca, C., Silla, S., Ayroldi, E., Fioretti, M.C. and Puccetti, P. (1999) IL-12 acts selectively on CD8 alpha- dendritic cells to enhance presentation of a tumor peptide in vivo. *J.Immunol.* **163**, 3100-3105.
- 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**, 1101-1111.
- 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**, 6230-6240.
- Hacker, H., Mischak, H., Hacker, G., Eser, S., Prenzel, N., Ullrich, A. and Wagner, H. (1999) Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases by CpG-DNA controls interleukin-12 release from antigen-presenting cells. *EMBO J.* **18**, 6973-6982.
- Halpern, M.D., Kurlander, R.J. and Pisetsky, D.S. (1996) Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol.* **167**, 72-78.

Hambleton, J., Weinstein, S.L., Lem, L. and DeFranco, A.L. (1996) Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **93**, 2774-2778.

Hartmann, G. and Krieg, A.M. (2000) Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J.Immunol.* **164**, 944-953.

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. (2000) Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J.Immunol.* **164**, 1617-1624.

Hartmann, G., Weiner, G.J. and Krieg, A.M. (1999) CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 9305-9310.

Herberman, R.B. (1997) Effect of alpha-interferons on immune function. *Semin.Oncol.* **24**, S9-S9.

Hibert, L. and Foster, G.R. (1999) Human type I interferons differ greatly in their effects on the proliferation of primary B cells. *J.Interferon.Cytokine.Res.* **19**, 309-318.

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A. and Murphy, K.M. (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria- induced macrophages. *Science* **260**, 547-549.

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**, 3642-3652.

Isaacs, A., Rotem, Z. and Fantes, K.H. (1966) An inhibitor of the production of interferon ("blocker"). *Virology* **29**, 248-254.

Jaiswal, A.I., Dubey, C., Swain, S.L. and Croft, M. (1996) Regulation of CD40 ligand expression on naive CD4 T cells: a role for TCR but not co-stimulatory signals. *Int.Immunol.* **8**, 275-285.

Jakob, T., Walker, P.S., Krieg, A.M., Udey, M.C. and Vogel, J.C. (1998) Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J.Immunol.* **161**, 3042-3049.

Janeway, C.A.J. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **54**, 1-13.

Jensen, K.E., Neal, A.L., Owens, R.E. and Warren, J. (1963) Interferon responses of chick embryo fibroblasts to nucleic acids and related compounds. *Nature* **200**, 433-434.

Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. and Enk, A.H. (1997) Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur.J.Immunol.* **27**, 3135-3142.

Karin, M. (1998) The NF-kappa B activation pathway: its regulation and role in inflammation and cell survival. *Cancer J.Sci.Am.* **4**, 92-99.

Kimura, Y., Sonehara, K., Kuramoto, E., Makino, T., Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T. and Tokunaga, T. (1994) Binding of oligoguanylate to scavenger receptors is required for oligonucleotides to augment NK cell activity and induce IFN. *J.Biochem.(Tokyo.)* **116**, 991-994.

Kirschning, C.J., Wesche, H., Merrill, A.T. and Rothe, M. (1998) Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J.Exp.Med.* **188**, 2091-2097.

Kline, J.N., Waldschmidt, T.J., Businga, T.R., Lemish, J.E., Weinstock, J.V., Thorne, P.S. and Krieg, A.M. (1998) Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J.Immunol.* **160**, 2555-2559.

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**, 2879-2883.

Kohrgruber, N., Halanek, N., Groger, M., Winter, D., Rappersberger, K., Schmitt-Egenolf, M., Stingl, G. and Maurer, D. (1999) Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J.Immunol.* **163**, 3250-3259.

Kopp, E.B. and Ghosh, S. (1995) NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv.Immunol.* **58**, 1-27.

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**, 170-178.

Krieg, A.M., Wu, T., Weeratna, R., Efler, S.M., Love-Homan, L., Yang, L., Yi, A.K., Short, D. and Davis, H.L. (1998) Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 12631-12636.

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**, 546-549.

Liang, H., Nishioka, Y., Reich, C.F., Pisetsky, D.S. and Lipsky, P.E. (1996) Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J.Clin.Invest.* **98**, 1119-1129.

Lipford, G.B., Bauer, M., Blank, C., Reiter, R., Wagner, H. and Heeg, K. (1997a) CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur.J.Immunol.* **27**, 2340-2344.

Lipford, G.B., Sparwasser, T., Bauer, M., Zimmermann, S., Koch, E.S., Heeg, K. and Wagner, H. (1997b) Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur.J.Immunol.* **27**, 3420-3426.

Liu, Y. and Janeway, C.A.J. (1992) Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**, 3845-3849.

Luft, T., Pang, K.C., Thomas, E., Hertzog, P., Hart, D.N., Trapani, J. and Cebon, J. (1998) Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J.Immunol.* **161**, 1947-1953.

Ma, X., Chow, J.M., Gri, G., Carra, G., Gerosa, F., Wolf, S.F., Dzialo, R. and Trinchieri, G. (1996) The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J.Exp.Med.* **183**, 147-157.

Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M. and O'Garra, A. (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J.Immunol.* **154**, 5071-5079.

Macatonia, S.E., Knight, S.C., Edwards, A.J., Griffiths, S. and Fryer, P. (1987) Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J.Exp.Med.* **166**, 1654-1667.

Macfarlane, D.E. and Manzel, L. (1998) Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J.Immunol.* **160**, 1122-1131.

McEver, R.P., Moore, K.L. and Cummings, R.D. (1995) Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J.Biol.Chem.* **270**, 11025-11028.

Messina, J.P., Gilkeson, G.S. and Pisetsky, D.S. (1991) Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J.Immunol.* **147**, 1759-1764.

Metcalf, D., Begley, C.G., Johnson, G.R., Nicola, N.A., Vadas, M.A., Lopez, A.F., Williamson, D.J., Wong, G.G., Clark, S.C. and Wang, E.A. (1986) Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **67**, 37-45.

Mojcik, C.F., Gourley, M.F., Klinman, D.M., Krieg, A.M., Gmelig-Meyling, F. and Steinberg, A.D. (1993) Administration of a phosphorothioate oligonucleotide antisense to murine endogenous retroviral MCF env causes immune effects in vivo in a sequence-specific manner. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **67**, 130-136.

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**, 1216-1224.

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**, 487-493.

Parronchi, P., Brugnolo, F., Annunziato, F., Manuelli, C., Sampognaro, S., Mavilia, C., Romagnani, S. and Maggi, E. (1999) Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4⁺ T cells into Th1 effectors. *J.Immunol.* **163**, 5946-5953.

Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C. and Samuel, C.E. (1987) Interferons and their actions. *Annu.Rev.Biochem.* **56**, 727-777.

Pisetsky, D.S. (1998) Antibody responses to DNA in normal immunity and aberrant immunity. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* **5**, 1-6.

Pugin, J., Heumann, I.D., Tomasz, A., Kravchenko, V.V., Akamatsu, Y., Nishijima, M., Glauser, M.P., Tobias, P.S. and Ulevitch, R.J. (1994) CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity.* **1**, 509-516.

Rattis, F.M., Peguet-Navarro, J., Staquet, M.J., Dezutter-Dambuyant, C., Courtellemont, P., Redziniak, G. and Schmitt, D. (1996) Expression and function of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human epidermal Langerhans cells. *Eur.J.Immunol.* **26**, 449-453.

Regnier, C.H., Song, H.Y., Gao, X., Goeddel, D.V., Cao, Z. and Rothe, M. (1997) Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* **90**, 373-383.

Res, P.C., Couwenberg, F., Vyth-Dreese, F.A. and Spits, H. (1999) Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. *Blood* **94**, 2647-2657.

Ridge, J.P., Di Rosa, F. and Matzinger, P. (1998) A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T- helper and a T-killer cell. *Nature* **393**, 474-478.

- Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal, M. and Liu, Y.J. (1999) Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* **283**, 1183-1186.
- Rogge, L., D'Ambrosio, D., Biffi, M., Penna, G., Minetti, L.J., Presky, D.H., Adorini, L. and Sinigaglia, F. (1998) The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs. *J.Immunol.* **161**, 6567-6574.
- Roman, M., Martin-Orozco, E., Goodman, J.S., Nguyen, M.D., Sato, Y., Ronaghy, A., Kornbluth, R.S., Richman, D.D., Carson, D.A. and Raz, E. (1997) Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat.Med.* **3**, 849-854.
- Rotem, Z., Cox, R.A. and Isaacs, A. (1963) Inhibition of virus multiplication by foreign nucleic acids. *Nature* **197**, 564-566.
- Roussel, M.F. (1998) Key effectors of signal transduction and G1 progression. *Adv.Cancer Res.* **74**, 1-24.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J.Exp.Med.* **182**, 389-400.
- Sano, H., Takai, O., Harata, N., Yoshinaga, K., Kodama-Kamada, I. and Sasaki, T. (1989) Binding properties of human anti-DNA antibodies to cloned human DNA fragments. *Scand.J.Immunol.* **30**, 51-63.
- Sato, Y., Miyata, M., Nishimaki, T., Kochi, H. and Kasukawa, R. (1999) CpG motif-containing DNA fragments from sera of patients with systemic lupus erythematosus proliferate mononuclear cells in vitro. *J.Rheumatol.* **26**, 294-301.
- Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M.D., Silverman, G.J., Lotz, M., Carson, D.A. and Raz, E. (1996) Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* **273**, 352-354.

- Schwartz, D.A., Quinn, T.J., Thorne, P.S., Sayeed, S., Yi, A.K. and Krieg, A.M. (1997) CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. *J.Clin.Invest.* **100**, 68-73.
- Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G.J. and Scollay, R. (1990) The generation and fate of thymocytes. *Semin.Immunol.* **2**, 3-12.
- 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**, 1835-1837.
- Slavik, J.M., Hutchcroft, J.E. and Bierer, B.E. (1999) CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol.Res.* **19**, 1-24.
- Snapper, C.M. and Mond, J.J. (1996) A model for induction of T cell-independent humoral immunity in response to polysaccharide antigens. *J.Immunol.* **157**, 2229-2233.
- Sparwasser, T., Hultner, L., Koch, E.S., Luz, A., Lipford, G.B. and Wagner, H. (1999) Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis. *J.Immunol.* **162**, 2368-2374.
- 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**, 2045-2054.
- Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Borschert, K., Hacker, H., Heeg, K. and Wagner, H. (1997a) Bacterial DNA causes septic shock. *Nature* **386**, 336-337.
- Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Hacker, H., Heeg, K. and Wagner, H. (1997b) Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *Eur.J.Immunol.* **27**, 1671-1679.
- Stacey, K.J., Sweet, M.J. and Hume, D.A. (1996) Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J.Immunol.* **157**, 2116-2122.

- Stahl, P.D. and Ezekowitz, R.A. (1998) The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr.Opin.Immunol.* **10**, 50-55.
- 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**, 2335-2342.
- Taylor, J.L. and Grossberg, S.E. (1998) The effects of interferon-alpha on the production and action of other cytokines. *Semin.Oncol.* **25**, 23-29.
- 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**, 955-962.
- Tokunaga, T., Yano, O., Kuramoto, E., Kimura, Y., Yamamoto, T., Kataoka, T. and Yamamoto, S. (1992) Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. *Microbiol.Immunol.* **36**, 55-66.
- Trinchieri, G. (1998) Immunobiology of interleukin-12. *Immunol.Res.* **17**, 269-278.
- Ulmer, A.J., Feist, W., Heine, H., Kirikae, T., Kirikae, F., Kusumoto, S., Kusama, T., Brade, H., Schade, U. and Rietschel, E.T. (1992) Modulation of endotoxin-induced monokine release in human monocytes by lipid A partial structures that inhibit binding of 125I-lipopolysaccharide. *Infect.Immun.* **60**, 5145-5152.
- 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**, 2372-2378.
- Vallin, H., Perers, A., Alm, G.V. and Ronnblom, L. (1999) Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.* **163**, 6306-6313.
- van Kooten, C. and Banchereau, J. (2000) CD40-CD40 ligand. *J.Leukoc.Biol.* **67**, 2-17.

- Weiner, G.J., Liu, H.M., Wooldridge, J.E., Dahle, C.E. and Krieg, A.M. (1997) Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 10833-10837.
- Welsh, R.M. (1984) Natural killer cells and interferon. *Crit.Rev.Immunol.* **5**, 55-93.
- Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S. and Cao, Z. (1997) MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* **7**, 837-847.
- Yamamoto, S., Kuramoto, E., Shimada, S. and Tokunaga, T. (1988) In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. *Jpn.J.Cancer Res.* **79**, 866-873.
- 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 and augment IFN- mediated natural killer activity. *J.Immunol.* **148**, 4072-4076.
- 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**, 983-997.
- 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**, 775-779.
- Yang, R.B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W.I., Gurney, A.L. and Godowski, P.J. (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* **395**, 284-288.
- 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**, 4918-4925.

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**, 5394-5402.

Yi, A.K. and Krieg, A.M. (1998a) CpG DNA rescue from anti-IgM-induced WEHI-231 B lymphoma apoptosis via modulation of I kappa B alpha and I kappa B beta and sustained activation of nuclear factor-kappa B/c-Rel. *J.Immunol.* **160**, 1240-1245.

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**, 4755-4761.

Yi, A.K. and Krieg, A.M. (1998c) Rapid induction of mitogen-activated protein kinases by immune stimulatory CpG DNA. *J.Immunol.* **161**, 4493-4497.

Zhou, L.J. and Tedder, T.F. (1996) CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 2588-2592.

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**, 3627-3630.