

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

Effekt von CpG-Oligonukleotiden auf die Funktion humaner T-Zellen und NK-Zellen

Barbara Marion Scherer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung der akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner, Ph-D. (Melbourne)
2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker

Die Dissertation wurde am 02.02.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 05.05.2004 angenommen.

Für meine Eltern und Grosseltern.

Abkürzungen und kleines Glossar

Adjuvans	Hilfsstoff, der zum Impfstoff zugesetzt die Impfreaktion verbessern soll
AET	2-Aminoethylisothiuronium (AET) Hydrobromid
APZ	Antigen Präsentierende Zelle
BCG	Bacille-Calmette-Guérin; Impfstoff gegen Tbc
Buffy Coat	Zellsuspension, die nach Gewinnung der Erythrozytenfraktion bei Eigenblutspenden zurückbleibt und zur Gewinnung von PBMZ eingesetzt wird
CD	Cluster of Differentiation
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
CpG-ODN	Cytosin Guanin reiche Oligonukleotide
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
HbS-Ag	Hepatitis B Surface Antigen
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethanolsulfonsäure Puffer
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
NK Zellen	Natürliche Killer Zellen, wichtige zytotoxische Effektorzellen des angeborenen Immunsystems
NTP	Nukleotid Triphosphat
MW	Mittelwert
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction; Gemischte Lymphozytenkultur
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMZ	Mononukleäre Zellen, des peripheren Bluts
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PRR	Pattern Recognition Receptor (hier Blut nach Ficoll Dichteseperation zur Abtrennung der Erythrozyten)
RT	Reverse Transkription
RNA	Ribonucleic Acid
RNS	Ribonukleinsäure
SRBZ	Schafserythrozyten
Stabw	Standardabweichung vom Mittelwert
Tbc	Tuberkulose (Erreger: Mycobacterium tuberculosis)
TLR	Toll like Receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TZR	T-Zell-Rezeptor

1 EINLEITUNG	7
1.1 BAKTERIELLE DNS UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE IMMUNOLOGIE	7
1.2 STRUKTURELLE BESONDERHEITEN BAKTERIELLER DNS UND CPG-OLIGONUKLEOTIDE	8
1.3 ERKENNUNG UND AKTIVIERUNGSMECHANISMUS	9
1.4 FUNKTIONELLER EINFLUSS VON CPG-OLIGONUKLEOTIDEN AUF DIE IMMUNANTWORT	11
2 FRAGESTELLUNG	13
3 MATERIAL UND METHODEN.....	13
3.1 MATERIAL:.....	13
3.1.1 LÖSUNGEN.....	13
3.1.2 OLIGONUKLEOTIDE	16
3.1.3 ZYTOKINE.....	17
3.1.4 ANTIKÖRPER.....	17
3.1.4.1 Antikörper zur Zellstimulation	17
3.1.4.2 Antikörper zur Neutralisation von Zytokinen in Zellkultur	17
3.1.4.3 Antikörper für ELISA Zytokinbestimmungen	18
3.1.5 ZELLINIEN	19
3.1.5.1 3T3-Fibroblasten	19
3.1.5.2 CTLL-2.....	19
3.1.5.3 K562	19
3.1.5.4 Daudi	19
3.1.5.5 B-721	20
3.2 METHODEN	20
3.2.1 ISOLATION MONONUKLEÄRER ZELLEN AUS DEM PERIPHEREN BLUT	20
3.2.2 ISOLIERUNG VERSCHIEDENER ZELLSUBPOPULATIONEN AUS PBMZ ODER VOLLBLUT	20
3.2.2.1 mit Hilfe magnetischer Separationssäulen	20
3.2.2.2 Isolation von Zellsubpopulationen aufgrund Adhärenzverhaltens	21
3.2.2.4 Isolation von T-Zellen aus PBMZ mit Hilfe von Schafserythrozyten.....	22
3.3 BESCHREIBUNG DER FUNKTIONELLEN UNTERSUCHUNGEN AN PBMZ UND SUBPOPULATIONEN	23
3.3.1 EINFACHE PBMZ IN VITRO KULTUR ZUR STIMULATION UND UNTERSUCHUNG DER ZYTOKINPRODUKTION UND OBERFLÄCHENMOLEKÜLEXPRESSION IN ABHÄNGIGKEIT VOM STIMULUS	23
3.3.2 GEMISCHTE LYMPHOZYTENKULTUR	23
3.3.3 UNTERSUCHUNG DER NK ZELL ZYTOTOXIZITÄT	24
3.3.3.1 4h ⁵¹ Cr-Freisetzungsversuch.....	24
3.4 METHODEN ZUR ÜBERWACHUNG UNTERSCHIEDLICHER ZELLFUNKTIONEN ..	26
3.4.1. BESTIMMUNG DER ZYTOKINFREISETZUNG IM ELISA.....	26
3.4.2 DURCHFLUßZYTOMETRIE IM FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTER (FACS):	26
3.4.1.1 Färbung von Oberflächenmolekülen	26
3.4.1.2 Intrazelluläre Färbung	28

3.4.3 ÜBERPRÜFUNG DER ZYTOKINTRANSKRIPTION MIT HILFE VON REVERSER TRANSKRIPTION (RT) UND POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR)	29
3.4.3.1 Isolation der RNA.....	29
3.4.3.2 Reverse Transkription	29
3.4.3.3 Taq Man PCR zur Quantifizierung der cDNS Proben.....	29
3.4.3.4 PCR zur Detektion von IL15 mRNA	30
3.4.3.5 CTLL-2 Assay zur Detektion von IL-15 im Zellüberstand	32
4 ERGEBNISSE	33
4.1 ETABLIERUNG DER GEEIGNETEN TESTZELLPOPULATION	33
4.2 VERHALTEN HUMANER PBMZ BEI ODN STIMULATION IN EINFACHER IN VITRO KULTUR.....	33
4.3 DIE BEDEUTUNG VON CD40 LIGAND UND T-ZELL-KOSTIMULATION FÜR DIE WIRKSAMKEIT VON CPG-OLIGONUKLEOTIDEN.....	36
4.4 WIRKUNG DER ODN INDUZIERTEN ZELL-AKTIVIERUNG AUF T-ZELL- FUNKTIONEN.....	40
4.4.1 MODELL DER GEMISCHTEN LYMPHOZYTENKULTUR ZUR BESCHREIBUNG DER ODN WIRKUNG AUF FUNKTIONELLE T-ZELL ANTWORTEN	40
4.4.2 ZYTOKIN INDUKTION EINER T-ZELL DIFFERENZIERUNG	44
4.4.3 EFFEKT VON ODN STIMULATION IN DER GEMISCHTEN LYMPHOZYTENKULTUR	45
4.5 EINFLUß CPG REICHER OLIGONUKLEOTIDE AUF DIE NK ZELL FUNKTION.....	47
4.5.1 STEIGERUNG DER NK-ZELL IFN- γ PRODUKTION	47
4.5.2 WIRKUNG VON CPG ODN AUF DIE EXPRESSION VON ZELLOBERFLÄCHENMOLEKÜLEN VON NK-ZELLEN.....	48
4.5.3 NK ZELL ZYTOTOXIZITÄTSASSAY.....	49
4.5.4 ABHÄNGIGKEIT DER GESTEIGERTEN ZYTOTOXIZITÄT VON ODN INDUZIERTEN ZYTOKINEN.....	51
4.5.4.1 Abhängigkeit von TNF- α , IFN- γ und IL-12.....	51
4.5.4.2 Abhängigkeit der CpG ODN induzierten Steigerung der NK Zell Aktivität von Interferon Typ I.....	55
4.5.4.3 Abhängigkeit der NK-Zell-Zytotoxizität von IL-15.....	61
4.5.4.3.1 Induktion von IL-15 mRNA durch CpG ODN auf humaner PBMZ Kultur	62
4.5.4.3.2 IL-15 auf der Zelloberfläche:	64
4.5.4.3.3 CTLL Bioassay.....	64
4.5.4.3.4 Funktioneller Nachweis von IL-15 – Einfluss von IL-15 blockierenden Antikörpern auf die NK-Zytotoxizität:	66
5 DISKUSSION	69
5.1 WIRKUNG VON ODN AUF DIE T-ZELL-DIFFERENZIERUNG.....	70
5.2 WIRKUNG DER ODN AUF DIE NK ZELL FUNKTION	72
5.2.1 IFN- γ PRODUKTION	73
5.2.2 CD 69 EXPRESSION	74
5.2.3 NK ZELLEN UND ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT.....	75
5.2.3.1 Abhängigkeit der gesteigerten Zytotoxizität von ODN induzierten Zytokinen	76
5.2.3.2 Abhängigkeit der gesteigerten Zytotoxizität von ODN induzierten Interferon α und β	77
5.2.3.3 Wie wirkt sich eine Depletion der Interferon produzierenden Zellen auf die NK-Zell- Zytotoxizität aus?	78
5.2.3.4 Sind stark Interferon α und β induzierende ODN besser als 2006?.....	78
5.2.3.5 Die Bedeutung von IL-15.....	79
5.3 POTENTIELLE BEDEUTUNG VON CPG-OLIGONUKLEOTIDEN FÜR DIE MEDIZIN	81

6 ZUSAMMENFASSUNG.....83

7 LITERATURVERZEICHNIS85

1 Einleitung

1.1 Bakterielle DNS und ihre Bedeutung für die Immunologie

Desoxyribonukleinsäure ist heute in aller Munde. Jeder kennt sie als den Stoff, aus dem die Gene sind, der für die Vererbung von Eigenschaften von einer Generation auf die nächste verantwortlich ist. Man kann DNS entschlüsseln, manipulieren und mit ihrer Hilfe beispielsweise gezielt Pflanzen verändern oder Bakterien zur Insulinproduktion bewegen. Als Informationsspeicher ist sie also durchaus wohlbekannt. Daß Desoxyribonukleinsäure allerdings nicht nur in der Datenübertragung und –speicherung von Bedeutung ist, sondern daneben noch Aufgaben für andere Funktionen eines Organismus erfüllt, wurde erst wesentlich später entdeckt. Auch in der Immunologie fand Desoxyribonukleinsäure lange Zeit wenig Beachtung. Sie galt als immunologisch inert. War sie doch in jeder Zelle vorhanden und durch ständigen Zellzerfall in jedem Organismus allgegenwärtig. Diese Betrachtungsweise änderte sich erst Anfang der achtziger Jahre. Man hatte in zahlreichen Tumormodellen in den siebziger Jahren festgestellt, daß die Applikation des Mykobakterien Impfstoffs Bacille Calmette Guérin, der zur Immunisierung gegen Tuberkulose eingesetzt wird, den interessanten Nebeneffekt zeigt, die Anti-Tumor-Aktivität positiv zu beeinflussen(5). Tokunaga et al. untersuchten Bacille-Calmette-Guérin damals, um den eigentlich immunstimulatorischen Bestandteil ausfindig zu machen und fanden heraus, daß es sich um die desoxyribonukleinsäure-enthaltende Fraktion handelte(59). Dies war verwunderlich, da man DNS bis dahin kaum biologische Aktivität zuschrieb. Zwar war schon länger bekannt, daß virale RNS und auch das Polynukleotid p:IC (rI, rC) immunologisch wirksam sind(58;67) – allerdings fiel es leichter, dies auf einen Effekt der Sekundärstruktur zurückzuführen, doppelsträngige RNS musste einer Vertebraten-Zelle ja fremd erscheinen. Für die Wirkung bakterieller DNS lag keine so offensichtliche Erklärung bereit. Es schlossen sich also Studien an, die versuchten Unterschiede zwischen bakterieller und Vertebraten Desoxyribonukleinsäure aufzuzeigen, um so die immunologische Wirksamkeit erklären zu können.

1.2 Strukturelle Besonderheiten bakterieller DNS und CpG-Oligonukleotide

Durch Fraktionierung des Mykobakterienimpfstoffs Bacille-Calmette-Guérin mit Hilfe von HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) hatten Tokunaga et al nachgewiesen, daß der stimulatorische Bestandteil von BCG DNS enthielt. Anschließende Stimulationsversuche vor und nach DNase Verdau zeigten, daß tatsächlich DNS für die Wirksamkeit der Fraktion verantwortlich war. Die enthaltene Desoxyribonukleinsäure bestand aus Oligonukleotiden mit einem Molekulargewicht um $2-4 \times 10^5$. Die Oligonukleotide waren einzelsträngig und steigerten sequenzunabhängig die NK-Zell-Zytotoxizität durch Induktion von IFN α/β und IFN γ . Um weitem Aufschluß über die Eigenschaften der stimulatorischen Oligonukleotide zu gewinnen, setzten(61;69) kurze Stücke aus bekannten c-DNS-Abschnitten ein. Dabei konnten sie zeigen, daß zwar DNS von Bakterien, Viren und Invertebraten nicht aber von Wirbeltieren und Pflanzen eine immunstimulatorische Wirkung haben(68). Sie konnten unterschiedliche Größe der DNS-Fragmente von Vertebraten und Invertebraten, sowie ungleiche Sensibilität gegenüber DNAsen oder Kontamination als Ursache für die Wirkungsunterschiede ausschließen. Auch Besonderheiten in der Sekundärstruktur der Oligonukleotide waren nicht ausschlaggebend. Die eigentliche Erklärung für dieses Phänomen fanden dann 1995 Krieg et al(33). DNS von Vertebraten und Invertebraten unterscheiden sich ganz wesentlich im Gehalt von Cytosin-Guanin Dinukleotiden. Während bei Invertebraten CG-Motive mit der statistisch voraussagbaren Häufigkeit von 1:16 vorkommen, findet man diese bei Vertebraten nur ungefähr ein viertel so oft zwischen 1:50 und 1:60(11). Eine Inversion des CG-Motivs zu GC oder kompletter Austausch der zwei Basen hob den stimulatorischen Effekt auf(3). Zusätzlich zur geringeren Häufigkeit ist bei Vertebraten das Cytosin meist methyliert. Es gelang nachzuweisen, daß auch stimulatorische Oligonukleotide aus bakterieller DNS nach Methylierung ihre Wirksamkeit einbüßen(33). Das aktivierende Prinzip war also gefunden: Einzelsträngige Oligonukleotide mit einem unmethylierten CpG Motiv. Als besonders wirksam erwiesen sich dabei Sequenzen, bei denen das CG-Motiv am 5'-Ende von zwei Purinen und am 3'-Ende von zwei Pyrimidinen eingerahmt wurde(33). Für Experimente werden Oligonukleotide mit einer Länge von ungefähr 20 Basen verwendet, deren Phosphor-Zucker-Gerüst zum Schutz gegen Nukleasen zu einem Phosphorothioat-Zucker-Gerüst modifiziert wurde.

Der entscheidende Unterschied zwischen Bakterien- und Vertebraten-DNS war also gefunden. Nun stellte sich die Frage, wie bakterielle DNS vom Immunsystem erkannt werden kann und was sie bewirkt.

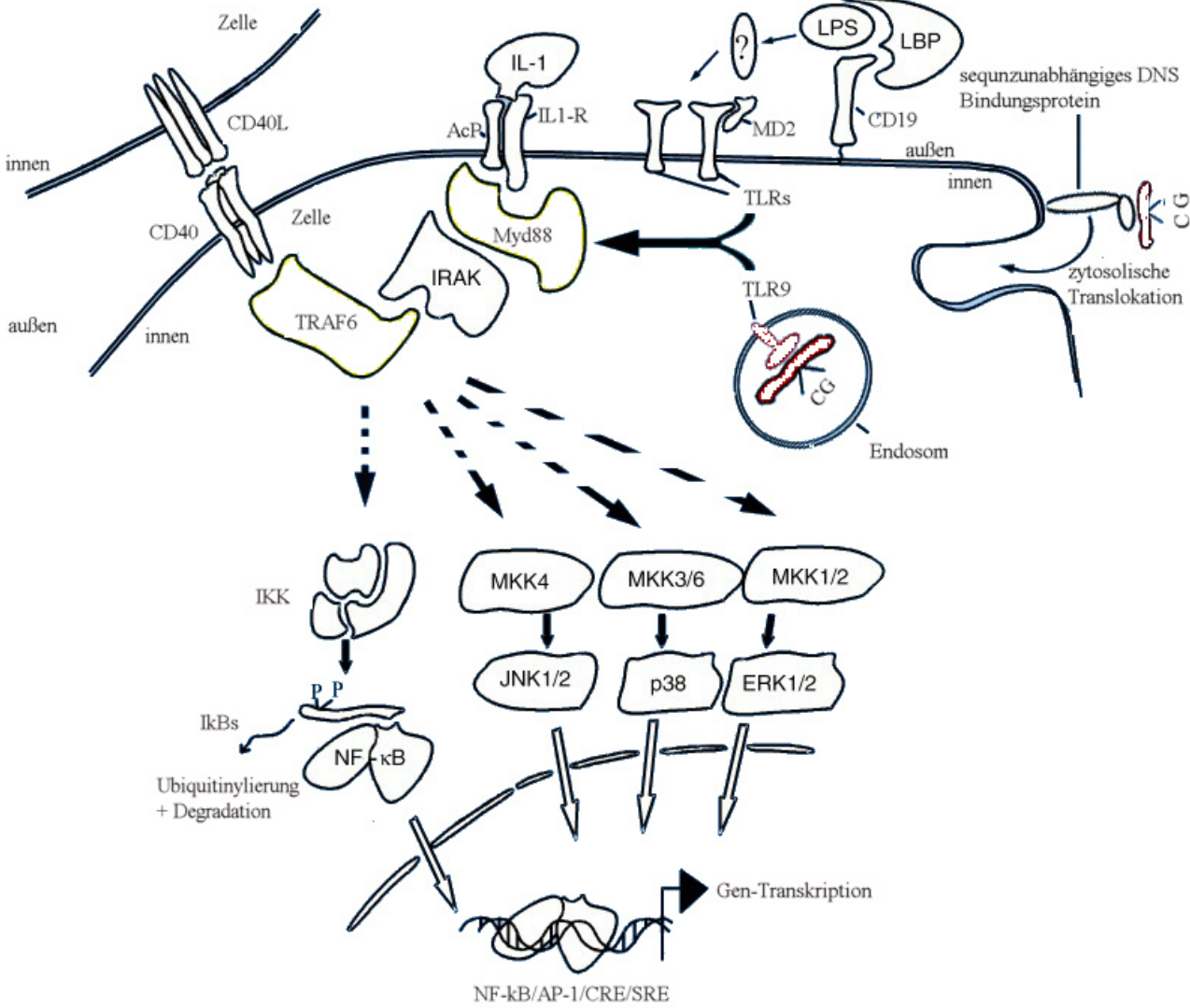
1.3 Erkennung und Aktivierungsmechanismus

Das Immunsystem funktioniert als ein Zusammenspiel alter nicht adaptiver Mechanismen der Angeborenen und evolutionär jüngerer Funktionen der Adaptiven Immunität. Dabei meint man heute der angeborenen Immunität die generelle Einschätzung der Infektionslage zuzuschreiben, die dann die Reaktion der Adaptiven Antwort beeinflusst und mit ihr zusammen versucht, die Integrität des Organismus zu wahren bzw. wieder herzustellen.

Dem Angeborenen Schenkel der Immunität stehen dabei verschiedene Erkennungsmechanismen zur Verfügung, die als so genannte Pattern Recognition Receptors, PRR, bezeichnet werden. Dabei handelt es sich um ererbte Rezeptorstrukturen, die sich im Laufe der Evolution gegen spezifische charakteristische Strukturen von Pathogenen, die so genannten PAMPs für Pathogen Associated Molecular Patterns entwickelt haben(45). Bekannte Vertreter dieser PAMPs sind z.B. Mannane in der Hefezellwand oder Bakterienzellwandbestandteile wie Lipopeptide, Peptidoglycane, Teichonsäuren und Lipopolysaccharid. LPS wird dabei zusammen mit einem LPS binding Protein (LBP) von CD14, TLR4 und Scavenger Rezeptoren erkannt.

Auch CpG-Oligonukleotide gehören zu den PAMPs und üben ihren Einfluss auf das Immunsystem damit über den angeborenen Schenkel aus. Sie werden von ihrem spezifischen PRR, TLR 9, erkannt(27) und vermitteln ihr Signal ins Zellinnere damit über den IL1/TLR Transduktionsweg. Nach Ligandbindung wird das Signal über MyD88, IRAK und TRAF6 weitergeleitet und führt nach entsprechender Kaskadenabfolge zur Aktivierung von NF- κ B, JNF und p38.

Abbildung 1.3 1



Nach dieser Darstellung der Signalweiterleitung in der Zelle, stellt sich die Frage, welchen Einfluss das Signal auf die Funktionen der Einzelzelle und damit auf deren Zusammenwirken in der Immunantwort hat

1.4 Funktioneller Einfluss von CpG-Oligonukleotiden auf die Immunantwort

Bei jeder klassischen Immunantwort wird zunächst eine Antigen-Präsentierende-Zelle mit einem Pathogen konfrontiert. Mit Hilfe von PRRs analysiert die Zelle das Pathogen, wird entsprechend aktiviert und teilt ihre Erkenntnisse je nach Art der APZ mit Hilfe von Zytokinproduktion, vermehrtem Einsatz kostimulatorischer Moleküle und Antigenpräsentation an andere APZ und an Effektorzellen mit. Bekannte Vertreter von APZ sind Dendritische Zellen, Makrophagen, Monozyten und B-Zellen, während es sich bei den Effektorzellen um T-Zellen, NK-Zellen aber auch B-Zellen und Monozyten/Makrophagen handelt.

Die Aktivierung des Immunsystems durch CpG-Oligonukleotide erfolgt im Wesentlichen entlang des oben beschriebenen Mechanismus.

Unter den Antigen präsentierenden Zellen kommt die größte Bedeutung den dendritischen Zellen zu. Sie werden durch CpG-Oligonukleotide mit Hilfe ihres Rezeptors aktiviert und steigern daraufhin die Expression kostimulatorischer Moleküle, wie z.B. CD 80, CD86, MHC Klasse I und II. Dadurch verbessern murine und humane DZs ihre Fähigkeit, Antigen zu präsentieren und mit Effektorzellen in vivo und in vitro zu kommunizieren (56;63) (57). Zusätzlich kommt es zu einer gesteigerten Ausschüttung von Zytokinen, sowohl inflammatorischer Art wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α als auch von Effektorzytokinen wie Typ I Interferone und Interleukin 12, die für die Funktion der Effektorzellen richtungweisend sind.

Humane dendritische Zellen zeigen unterschiedliche Reaktionsbereitschaft auf CpG-Oligonukleotid Stimulation. Myeloide dendritische Zellen (MDZ) tragen auf ihrer Zelloberfläche TLR-2 und TLR-4 und reagieren auf Stimulation mit LPS. Sie besitzen jedoch nicht TLR-9 und sind also auch nicht durch CpG stimulierbar. Plasmazytoide dendritische Zellen (PDZ) hingegen exprimieren den TLR-9, jedoch nicht TLR-2 und TLR-4, und reagieren somit auf CpG Stimulation und nicht auf LPS(8).

Weitere Vertreter der antigenpräsentierenden Zellen sind auch Makrophagen und Monozyten. Humane Monozyten und Makrophagen sind nicht CpG Oligonukleotid responsiv. Dies wird auf die Tatsache zurückgeführt, dass sie den CpG Rezeptor TLR-9 nicht exprimieren(8).

Maus-Monozyten / Makrophagen hingegen werden durch CpG ODN aktiviert und steigern daraufhin die Aufnahme von Pathogen, was eine effektivere Antigen Präsentation zur Folge hat. Auch Makrophagen verwenden Zytokine als weiteres Kommunikationsmittel; dabei produzieren sie insbesondere IFN Typ-I, IL12, IL6 und TNF- α (39). Ursprünglich wurde außerdem angenommen, dass auch die Effektorfunktion der Monozyten und Makrophagen, die Pathogen Eliminierung, durch Oligo-Stimulation verbessert wird. Zum einen durch eine Steigerung der antigen-abhängigen Zytotoxizität zum anderen durch Induktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten/-radikale in den Phagosomen(74), diese Aussagen wurden jedoch später nicht bestätigt.

Auf humane und murine B-Zellen wirken CpG-Oligonukleotide direkt mitogen (33). Die B-Zellen werden resistent gegen spontane oder induzierte Apoptose(72;73) und exprimieren vermehrt Klasse II MHC, CD80, CD86(37). Zum weiteren produzieren B-Zellen Interleukin 6 und 10 und bei Stimulation zusammen mit einem Antigen bilden sie vermehrt Immunglobulin(71).

Die beschriebenen Effekte von Oligonukleotid auf APZs bewirken also eine vermehrte Kostimulationsbereitschaft und eine gesteigerte Zytokinproduktion und bereiten damit den Boden für eine nachgeschaltete Aktivierung von Effektorzellen.

Weder humane noch Maus T-Zellen können direkt durch CpG ODN aktiviert werden. Sie werden vielmehr im Laufe der Aktivierung des Immunsystems nach ODN Stimulation durch ein Zusammenwirken verschiedener Signale aktiviert. CD8 positive zytotoxische T-Zellen des humanen und murinen Immunsystems produzieren nach ODN Stimulation vermehrt IFN- γ und steigern ihre antigenabhängige Zytotoxizität (9) (32). CD 4 positive T-Helferzellen werden weiter unterteilt. Im murinen Immunsystem kann man CD3 CD4 positive Zellen aufgrund ihrer Zytokinproduktion in verschiedene Gruppen einteilen. Dabei werden Zellen, die vornehmlich IFN- γ , IL-12 und TNF- β sezernieren als TH-1 Zellen bezeichnet. Sie haben ihre Funktion in der Vermittlung von DTH und in der Bekämpfung von intrazellulären Organismen und Parasiten. Eine weitere Gruppe von T Zellen, die als TH-2 Zellen bezeichnet werden, produzieren vornehmlich IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13. Ihre Bedeutung liegt in der Vermittlung einer gesteigerten Antikörperproduktion durch B-Zellen.

CpG Stimulation und deren nachgeschaltete Effekte auf das Immunsystem, nämlich Zytokinproduktion und Verbesserung der Zell-Zell-Interaktion, beeinflussen murine T-Helferzellen im Sinne einer TH-1 Differenzierung (41). Das bedeutet, daß die T-Zellen z.B. mehr Interferon- γ und weniger Interleukin 4 produzieren, generell kommt es dadurch zu einer

Erregerelimination. Im humanen System ist die Einteilung in TH-1 und TH-2 Zellen nicht so klar definierbar, jedoch bewirken CpG ODN auch hier eine Steigerung der IFN- γ Produktion. Ein weiterer Vertreter der Effektorzellen ist die Natürliche Killerzelle (NK). Sie werden im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen des Immunsystems nicht nur mit Hilfe positive Signale aktiviert, sondern auch durch den Wegfall negativer Signale(42;47). Ihre Hauptaufgabe ist es, Zellen zu erkennen und zu eliminieren, die auf ihrer Oberfläche keine, zu wenig oder veränderte MHC I Moleküle tragen. Das durch CpG induzierte TH-1 Zytokinmilieu führt sowohl bei den humanen als auch bei murinen NK-Zellen zu einer Steigerung der Interferon- γ Produktion (29) und zu einer Erhöhung der zytotoxischen Aktivität(3). Dadurch wird die Elimination von pathologisch veränderten Zellen verbessert, was sowohl zur Kontrolle von Virusinfektionen als auch von Tumorerkrankungen von entscheidender Bedeutung ist(14).

2 Fragestellung

Im Gegensatz zum Mausmodell waren im humanen System einige Aspekte der CpG-Oligonukleotid-Wirkung nicht klar etabliert. In vitro Studien an unserem Institut hatten gezeigt, daß humane PBMZ durch CpG-Oligonukleotid-Stimulation zur Produktion von IL-12, IL-6, TNF- α , IFN- γ und Typ I Interferon bewegt werden. Unser Anliegen war es, herauszufinden, wie sich die Produktion dieser Zytokine auf das funktionelle Verhalten von T-Zellen und Natürlichen Killerzellen auswirkt.

3 Material und Methoden

3.1 Material:

3.1.1 Lösungen

AET Lösung - 2-Aminoethylisothioruonium Hydrobromid Lösung

0,5 g AET Hydrobromid werden in 12,5 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wird mit NaOH der pH auf 9 eingestellt und die Lösung durch einen 0,2 Mm Filter steril filtriert.

Die Lösung sollte vor Gebrauch frisch hergestellt werden und dient Vorbehandlung von Schafserythrozyten zu T-Zell-Separation.

Ammoniumchlorid Lösung

Ammoniumchlorid Lösung diente zur Lyse von Erythrozyten, z.B. nach Rosettierung von T-Zellen mittels Schafserythrozyten. Zur Herstellung wurden 8,3g NH₄Cl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in 1000 ml Aqua_{bidest} gelöst und mit 111ml Tris (170mM) gepuffert. Die entstandene 140 mM Ammoniumchloridlösung wurde auf einen pH von 7,2 eingestellt, steril filtriert und portioniert bei 4°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Zellkulturmedium

Für die Herstellung von Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 (Biochrom, Seromed, Berlin) verwendet. Für die Kultivierung humaner Zellen enthielt es folgende Zusätze:

Substanzname	Quelle	Konzentration
HEPES (Hydroxyethylpiperazin-ethanolsulfonsäure Puffer)	Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland	2,4 g/l
Bikarbonat NaHCO ₃	Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland	1,2 g/l
Antibiotika:		
Penicillin G	Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland	60 µg/ml
Tylosintartrat	Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland	10 µg/ml
Streptomycinsulfat	Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland	125 µg/ml
L-Glutamin	Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland	10 mM
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	50 µM
Fötale Kälberserum (FKS) <u>oder</u>	Vitomex, Selters, Deutschland	10% (v/v)
Autologes Serum	Jeweiliger Spender	10% (v/v)
Pyruvat (optional)	Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland	1mM

Das Medium wurde auf einen pH von 7,2 eingestellt, steril filtriert (0,22 µm Filter, Sartorius, Göttingen, Deutschland), portioniert und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

Zu Instamed PBS Dulbecco wurden (Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland) Antibiotika zugesetzt (vgl. oben). Nach Einstellung des pH auf 7,2 wurde PBS steril filtriert (0,22 µm Filter, Sartorius, Göttingen, Deutschland) und portioniert und bei 4°C gelagert. Die fertige Lösung enthielt: 4 mM Na₂HPO₄, 140 MM Na Cl und 20 mM KCl.

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, durch ein Filterpapier filtriert, portioniert und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert. Die Lösung wurde für Vitalfärbungen von Zellsuspensionen in Verhältnissen zwischen 10:1 bis 1:1 verwendet.

Ficoll-Hypaque Lösung

Zur Aufreinigung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut wurden Erythrozyten und Granulozyten durch Zentrifugation über Ficoll-Hypaque Lösung von 1.077 g/l Dichte (Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland) abgetrennt.

„Hanks Balanced“ Salz Lösung (HBSS)

“Hanks balanced” Salz Lösung (Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland) ist eine komplexe Salzlösung, die mit 350 mg/l Bikarbonat und den 3 oben genannten Antibiotika versetzt, auf einen pH von 7,2 eingestellt und steril filtriert wurde (0,22 µm Filter, Sartorius, Göttingen, Deutschland). Sie diente zum Waschen der Zellen nach Dichtezentrifugation und erleichtert die Abtrennung der Thrombozyten von den PBMZ.

Paraformaldehyd-Fixierlösung (PFA)

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

Saponin Lösung zur Intrazellulären FACS Färbung

PBS wurde mit 0,5 % Saponin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 0,05 % (g/v) Natriumazid (Schuhardt, Hohenbrunn, Deutschland) und 0,5 % Bovines Serum Albumin (BSA) versetzt. Der Zusatz von Saponin diente der Perforation der Zellmembran, um so die Diffusion der Antikörper ins Zytoplasma zu ermöglichen.

Trypsin/EDTA-Lösung

Adhärenz wachsende Zellen wurden 5 min bei 37 °C mit Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland) inkubiert, um sie von den Kulturflaschen ablösen zu können. Die Zellen wurden anschließend mit Zellkulturmedium gewaschen.

3.1.2 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
2006	5'- TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT – 3'
2006K	5'- TGC TGC TTT TGT GCT TTT GTG CTT – 3'
AP1	5'- GCT TGA TGA CTC AGC CGG AA -3'

Alle verwendeten Oligodesoxynukleotide (ODN) wurden von TibMolBiol (Berlin, Deutschland) bezogen; sie sind einzelsträngig und Phosphorothioat stabilisiert. Die ODN wurden in Ultra-Pure Water (Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland) lyophilisiert, auf die Konzentration von 250 µM eingestellt und durch Anotop 0,2 µm Spezialfilter (Whatman, Maidstone, England) steril filtriert. Bis zum Gebrauch wurden sie portioniert bei –20 °C gelagert.

3.1.3 Zytokine

Bezeichnung	Quelle	Lagerung
Interleukin 2 (IL 2)	Eurocetus, Amsterdam, Niederlande	Stammlsg. 30 000 U/ml -70 °C Arbeitslsg. 1 000 U/ml 4 °C
Interleukin 4 (IL 4)	Pharmingen, San Diego, CA, USA	Stammlösung 10 ng/μl -20 °C
Interleukin 12 (IL12)	Pharmingen, San Diego, CA, USA	Stammlsg. 10 ng/μl -20 °C
Interferon Typ I	PBL Biomedical Laboratories New Brunswick, NJ, USA	Stammlsg. 1x10 ⁶ U/ml -20 °C

3.1.4 Antikörper

Antikörper zu Oberflächenfärbung

Siehe dort.

3.1.4.1 Antikörper zur Zellstimulation

Bezeichnung	Isotyp	Quelle
Maus anti human CD3	IgG1 (Klon UCHT1)	Immunotech, Marseilles, Frankreich

3.1.4.2 Antikörper zur Neutralisation von Zytokinen in Zellkultur

Bezeichnung	Isotyp	Konzentration	Quelle
Kaninchen anti human IFN α	Polyklonales Serum, Kaninchen anti Human	1000 U/ml (U entspr. blockierender Aktivität)	PBL Biomedical Laboratories New Brunswick, NJ, USA
Kaninchen anti human IFN β	Polyklonales Serum, Kaninchen anti Human	1000 U/ml (U entspr. blockierender Aktivität)	PBL Biomedical Laboratories New Brunswick, NJ, USA

Maus anti human IL 2	IgG ₁ (Klon 5334,21)	10 µg/ml	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Ratte anti human IL 4		10 µg/ml 200 ng/ml	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Ziege anti human IL 12	IgG Ziege	10 µg/ml	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Maus anti human IL 15	IgG ₁ (Klon 34593,11)	10 µg/ml	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

3.1.4.3 Antikörper für ELISA Zytokinbestimmungen

Abkürzungen in dieser Tabelle C.: „Capture“ Antikörper

D.: „Detection“ Antikörper

S.: Standard Zytokin; soweit nicht anders angezeigt
rekombinantes Protein

Spezifität	Klone	Quelle
Human IL 2	C.: Ratte anti Human; IgG ₁ D.: Maus anti Human; IgG ₁	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Human IL 4	C.: Maus anti Human; IgG ₁ D.: Ratte anti Human; IgG ₁	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Human IL 6	C.: Ratte anti Human IgG ₁ D.: Ratte anti Human IgG _{2A}	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Human IL 10	C.: Ratte anti Human u. Viral; IgG _{2A} D.: Ratte anti Human; IgG _{2A}	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Human IL 12 p40/70	C.: p40; Ratte anti Human IgG ₁ D.: p40/p70; Maus anti Human IgG ₁ S.: rekombinantes p40 Monomer	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Human IL12 p40	C.: p40; monoklonal Maus IgG ₁ D.: rhIL-12; Ziege anti Human, IgG S.: rekombinantes IL 12 p40	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Human IL 15	C.: Maus anti Human IgG ₁ D.: Maus anti Human IgG ₁	Pharmingen, San Diego, CA, USA

Human IL15	Quantakine Colorimetric Plate	PBL Biomedical Laboratories New Brunswick, NJ, USA
Human TNF α	C.: Maus anti Human IgG ₁ D.: Maus anti Human IgG ₁	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Human IFN γ	C.: Maus anti Human IgG ₁ D.: Maus anti Human IgG ₁	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Human IFN alpha	Vorgefertigter ELISA Kit	PBL Biomedical Laboratories New Brunswick, NJ, USA

3.1.5 Zelllinien

3.1.5.1 3T3-Fibroblasten

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 Neomycin Derivat Geneticinsulfat (G418) in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt (GIBCO, Eggenstein, Deutschland).

3.1.5.2 CTLL-2

Zytotoxischer T-Zell-Lymphoblast von der Maus (C57Bl/6). Zelllinie wächst nur in Gegenwart von IL2 und auch IL4 oder IL15. Und kann deshalb als sensitiver Bioessay für IL2, IL4, IL15 verwendet werden.

3.1.5.3 K562

Zelllinie aus dem Knochenmark einer 53-jährigen CML Patientin (chronische myeloische Leukämie). Die Zelle hat einen weiblichen Karyotyp, ist hochgradig undifferenziert, gehörter der Granulozytären Linie an und ist EBNA negativ. Sie wird als hochsensitive Zielzelle zu Untersuchungen der NK Zell Zytotoxizität eingesetzt.

3.1.5.4 Daudi

Burkitt Lymphom Linie, trägt EBV. B-Zell-Lymphoblast des peripheren Blutes stammt von einem 16 jährigen schwarzen Burkitt Lymphom Patienten. Zellen sind negativ für β -2-

Mikroglobulin und werden traditionell in NK Zell Zytotoxizitätsassays eingesetzt. Andere Oberflächenmoleküle sind Komplement Rezeptoren, FcR für IgG.

3.1.5.5 B-721

Humane B-Zell-Lymphomlinie, die stark MHC Klasse I und II Moleküle exprimiert. Deshalb sollte sie nicht von Natürlichen Killer Zellen (NK) erkannt werden und wurde als Kontrollzelllinie in Zytotoxizitätsversuchen verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Isolation mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut

Als Ausgangsquelle wurden entweder frisches Blut von freiwilligen Spendern oder Buffy Coats verwendet, die als Zellsuspensionen nach Gewinnung von Erythrozyten-konzentraten bei der Eigenblutspende als Nebenprodukte anfallen und bisher in der Klinik keine weitere Verwendung finden (dies soll ab 2001 geändert werden – aus Buffy Coats müssen dann bayernweit Thrombozytenkonzentrate hergestellt werden).

Die Zellsuspension, wurde 1:1 mit PBS verdünnt und anschließend mit Ficoll-Hypaque Lösung der Dichte 1,077 g/ml (Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland) unterschichtet. Dabei wurden 3 ml Ficoll je 5 ml peripherem Blut verwendet. Nach 25 min Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde die Interphase über der Ficoll Schicht vorsichtig abgenommen und mit Hanks Balanced Salz Lösung (Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland) dreimal gewaschen. Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurden die Zellen in komplettem RPMI Medium (siehe; Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland) aufgenommen. Die Zellkonzentration wurde nach Eosinfärbung in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

3.2.2 Isolierung verschiedener Zellsubpopulationen aus PBMZ oder Vollblut

3.2.2.1 mit Hilfe magnetischer Separationssäulen

Zellen verschiedener Subpopulationen tragen auf der Oberfläche spezifische Antigene, gegen die durch Immunisieren anderer Spezies spezifische Antikörper gewonnen werden können.

Die so konstruierten Antikörper reagieren also spezifisch mit einer Zellsorte und können zu unterschiedlichen Zwecken eingesetzt werden. Durch Antikörper gegen das CD3 Molekül können zum Beispiel T-Zellen stimuliert oder angefärbt werden, usw. Hier soll eine Methode dargestellt werden, bei der spezifische Antikörper an Metallkugeln gekoppelt werden. Die Metallkugeln bestehen aus Eisenoxid, haben ungefähr einen Durchmesser von 50nm und besitzen paramagnetische Eigenschaften. Die gekoppelten spezifischen Antikörper binden an die Zellen, die so mit Metallkugeln markiert werden und mit Hilfe starker Magneten aus den übrigen Zellen herausgefischt werden können. Mit dieser Methode der magnetischen Zellseparation können entweder Zellpopulationen aus der Ausgangspopulation entfernt werden oder es kann eine Sorte Zellen angereichert werden. Wenn eine bestimmte Sorte Zellen angereichert werden soll, kann das entweder dadurch geschehen, dass ein Marker dieser Zelle zu Positivselektion verwendet wird, oder die anderen Zellen können durch ein Mix verschiedener Antikörper markiert werden und es bleibt zum Schluß im Sinne einer Negativselektion nur die gesuchte Zellart übrig. Wenn die isolierten Zellen anschließend in Bioassays verwendet werden sollen ist häufig die Negativselektion günstiger, da Markierung der Zellen zu Aktivierung führen oder durch Blockierung dieses Oberflächenmoleküls die Zell-Zell-Interaktionen stören kann.

3.2.2.2 Isolation von Zellsubpopulationen aufgrund Adhärenzverhaltens

Die Isolation von Monozyten basiert auf der Adhärenz der Zellen an Plastikoberflächen. Die Zellen werden in einer Zelldichte von 12×10^6 /Reaktionstöpfchen in 12-Loch-Platten in Medium mit 10% FKS für 2 Stunden in einem Brutschrank (bei 37 °C, 5% CO₂ und % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Durch Rotieren der Platten werden die nicht adhärenen Zellen abgelöst und mit dem Überstand abgesaugt. Die am Plastik haftenden Zellen werden nochmals mit Medium gewaschen und für eine weitere Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, gewaschen, gezählt und in neue Kulturschalen gesetzt. Die Reinheit der so gewonnenen Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie am FACS Gerät überprüft und ergab einen Monozytenanteil von über 90%.

3.2.2.4 Isolation von T-Zellen aus PBMZ mit Hilfe von Schafserythrozyten.

Humane T-Zellen tragen auf der Oberfläche das CD2 Antigen, welches mit einem Oberflächenantigen auf Schafserythrozyten kreuzreagiert und bewirkt, daß diese beiden Zellen zusammen Rosetten bilden, wenn sie zusammen inkubiert werden. Da die T-Zell-Schafserythrozyten-Rosetten anschließend schwerer sind als die anderen Zellen, kann man sie in einem weiteren Dichtezentrifugationsschritt (vgl. 3.2.1) mit Ficoll-Hypaque Lösung der Dichte 1,077 g/ml von den restlichen PBMZ abtrennen.

Dazu wurden 15 bis 25 ml Schafserythrozyten (SRBZ) in Alsever Lösung in ein 50 ml Reaktionsgefäß gebracht, mit HBSS aufgefüllt und bei 1000g und Raumtemperatur (RT) 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die SRBZ in HBSS resuspendiert und bei denselben Bedingungen dreimal gewaschen. Zu zwei ml abzentrifugierten SRBZ wurden dann 8 ml 2-Aminoethyl-Isothiuronium-Bromid Lösung (AET) hinzu gegeben und die Zellsuspension wurde für 20 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach 20 Minuten sollte eine deutliche Farbveränderung der SRBZ von rot zu einem schmutzigen dunkelrot festzustellen sein. Nach Inkubation wurde die Lösung von AET und SRBZ mit kaltem PBS aufgefüllt und 10 Minuten bei RT und 400g zentrifugiert. Die Zellen wurden daraufhin zweimal mit PBS gewaschen und zum Schluß in 48 ml RPMI aufgenommen, so daß die abschließende Konzentration der SRBZ 4% vol/vol betrug. Nun wurden $\leq 4 \times 10^7$ PBMZ bei 400g und RT für 10 Minuten zentrifugiert. Nach dekantieren des Überstandes wurden die PBMZ in RPMI Medium auf eine Konzentration von 1×10^7 eingestellt. Dazu wurden 2 ml hitzeinaktiviertes FKS und 4 ml der 4% SRBZ Suspension gegeben, alles zusammen wurde anschließend bei 4 °C und 200g für 5 Minuten zentrifugiert. Es folgte ein Inkubationsschritt für eine Stunde auf Eis. Danach wurde die Lösung sanft resuspendiert, im Verhältnis 3:10 mit Ficoll-Hypaque Lösung unterschichtet und für 35 Minuten bei 900g und 4 °C zentrifugiert. Nach diesem Schritt befanden sich die T-Zellen zusammen mit den SRBZ unter der Ficoll-Hypaque Schicht, die restlichen PBMZ sitzen in der Interphase über dem Ficoll. Nun mußten die einzelnen Zellphasen vorsichtig getrennt und mit HBSS gewaschen werden. Die Schafserythrozyten wurden anschließend am besten in beiden Fraktionen mit Hilfe von NH_4Cl lysiert. Dazu wurden 5 ml NH_4Cl zum Zellniederschlag zugegeben und die Suspension im Wasserbad bei 37 °C für knappe 5 Minuten inkubiert. Die Lyse der SRBZ wird durch einen Farbumschlag von rot nach lackrot deutlich. Anschließen mußten die Zellen in HBSS mehrfach gewaschen und in RPMI resuspendiert werden. Die T-Zell-Fraktion erwies sich im

FACS als 96% rein, wobei auch die Kontamination von T-Zellen in der Restfraktion, die im Folgenden als Antigen präsentierende Zellen (APZ) bezeichnet werden soll, mit 0,6% sehr gering war.

3.3 Beschreibung der funktionellen Untersuchungen an PBMZ und Subpopulationen

3.3.1 Einfache PBMZ in vitro Kultur zur Stimulation und Untersuchung der Zytokinproduktion und Oberflächenmolekülexpression in Abhängigkeit vom Stimulus

Zellen wurden wie unter 3.2.1 isoliert und in einer Konzentration von $2 - 5 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter und Reaktionsgefäß in 24 Lochplatten ausgesät. Zum Kulturmedium (vgl. 3.x) wurden unterschiedliche Zusätze gegeben. Danach wurden die Zellen bei 37 °C, 5% CO₂ und Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Nach 8h für TNF bzw. 24h für IL6, IL10, IL12, IL15, IFN γ oder Typ I Interferon wurden Zellüberstände gewonnen und im ELISA auf die Zytokinkonzentration (vgl. 3.4.1) untersucht. Des Weiteren wurde die Expression von Zelloberflächenmolekülen mittels FACS Analyse beobachtet (siehe 3.4.2).

3.3.2 Gemischte Lymphozytenkultur

PBMZ wurden aus Zellsuspensionen von zwei verschiedenen Eigenblutspenden (wie unter 3.2.1) isoliert und mit Hilfe von Schafserythrozyten (siehe 3.2.2.4) in eine Fraktion von APZ und T-Zellen aufgetrennt. Anschließend wurden je 2×10^6 T-Zellen des einen Spenders mit je 1×10^6 Zellen des anderen Spenders in einem Milliliter Medium (siehe 3.1.1) pro Reaktionsgefäß in 24-Lochplatten ausplattiert und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zum Medium wurden je nach Fragestellung verschiedene Stimuli zugesetzt. Am dritten Tag wurden die Zellen gewaschen und in neue Platten gesetzt, für die folgenden 5 Tage wurden T-Zellen mit 10 U/ml IL2 expandiert. Am Tag sieben wurden die Zellen gezählt und in 96-Loch-Rundbodenplatten, die mit 10 μ g/ml anti CD3 vorbeschichtet waren, zu je 100 000 / Loch restimuliert. Anschließend erfolgte intrazelluläre Färbung (siehe

3.4.2) von IFN- γ und IL-4 nach 8 h oder Zytokinbestimmung im Zellüberstand mit ELISA nach 24 h (siehe 3.4.1).

3.3.3 Untersuchung der NK Zell Zytotoxizität

3.3.3.1 4h ^{51}Cr -Freisetzungsversuch

PBMZ wurden wie unter 3.2.1 isoliert und in Zellmedium bei einer Konzentration von 2×10^6 in 24-Lochplatten im Brutschrank inkubiert. Dem Zellmedium wurden je nach Fragestellung verschiedene Stimulantien und blockierenden Antikörper zugesetzt.

Am folgenden Tag wurden Zielzellen für die NK Zell Zytotoxizität vorbereitet. Zielzellen sind Zellen, die entweder durch NK Zellen zerstört werden können, wie z.B. K 562, die keinen MHC I Komplex exprimieren und deshalb von NK Zellen erkannt werden. Es können aber auch zur Kontrolle andere Zellen verwendet werden, die von NK Zellen erst nach Aktivierung oder gar nicht erkannt werden. Die Zielzellen wurden in der Wachstumsphase geerntet und mit 28 MBq ^{51}Cr pro 1×10^6 Zellen in 200 μl für 1 – 1,5 std. im Brutschrank inkubiert, damit sie Cr aufnehmen.

In der Zwischenzeit wurden die PBMZ gewaschen, gezählt und in 100 μl Medium auf 96-Loch-Rundbodenplatten mit einer Startkonzentration von 500 000 Zellen/ml und 7 Verdünnungsschritten aufgebracht. Es erfolgten jeweils Dreifachbestimmungen, eine Reihe pro Platte blieb jeweils ohne PBMZ, um später Spontane und Maximale Cr Freisetzung bestimmen zu können.

Danach wurden die Zielzellen dreimal gewaschen und in je 100 μl Zellsuspension einer Konzentration von 1×10^4 /ml auf die vorverdünnten PBMZ ausgesät.

Effektorzellen und Zielzellen wurden nun zusammen für 4h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden je 100 μl Überstand abgenommen und in Spezialröhrchen in einen γ -Zähler gestellt. Die Menge freigesetzten Cr im Überstand ist dabei proportional zur Anzahl der zerstörten Zielzellen bzw. der Aktivität der NK Zellen.

Zur Bestimmung der Spontanfreisetzung wurden Überstände von allein inkubierten Zielzellen abgenommen, für Maximalfreisetzung wurde die Zielzellen lysiert.

Zur vergleichenden Darstellung und Beurteilung der zytotoxischen Aktivität wurden verschiedene Methoden verwendet.

Entweder die Ergebnisse wurden in Graphiken dargestellt, die % Lyse auf der y-Achse und das Effektor-: Zielzellverhältnis auf der x-Achse abbildeten, oder es wurden Formeln zur

Beschreibung der NK-Zell-Zytotoxizität verwendet, die einen quantitativen Vergleich ermöglichen.

Spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Spez. Lyse} = \frac{(\text{Gemessene Aktivität} - \text{Spontanaktivität})}{(\text{Max. Aktivität} - \text{Spontanaktivität})}$$

Lytische Einheiten:

Lytische Einheiten sind eine Methode zur Beschreibung und zum quantitativen Vergleich von NK Zell Zytotoxizität unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Sie beschreiben, wie viele Effektorzellen einer bestimmten Versuchspopulation benötigt werden, um eine bestimmte Menge Zielzellen zu einem bestimmten Prozentsatz zu lysieren. Um Lytische Einheiten berechnen zu können, muss die Aktivität der NK Zellen in allen Versuchsbedingungen im selben Bereich von Effektor-/Zielzellverhältnis linear anwachsen, sonst sind Vergleiche nicht korrekt.

Sie werden nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Lytische Einheiten pro } 10^7 \text{ Effektorzellen} = \frac{\text{E-Standard}}{(\text{E:T}\%) (\text{T-Standard})}$$

Dabei ist:

E-Standard	Häufig als 10^7 Effektorzellen gewählt
E:T%	Das Effektor- zu Zielzell Verhältnis bei einer bestimmten Prozentzahl lysierter Zielzellen.
T-Standard	Die Targetzell-Menge pro Versuchsgefäß

3.4 Methoden zur Überwachung unterschiedlicher Zellfunktionen

3.4.1. Bestimmung der Zytokinfreisetzung im ELISA

Überstände von Zellkulturen wurden aus verschiedenen Ausgangssituationen gewonnen.

TNF wurde 8h nach Stimulation bestimmt. Die Überstände für IL6, IL10, IL12, IL15, IFN- γ und Typ I Interferon Bestimmung wurden 24h nach Stimulation abgenommen. Für Aussagen über die Zytokinproduktion von T-Zellen, wurden nach MLR (mixed lymphocyte reaction) Zellüberstände für die Messung von IL4 und IFN- γ an Tag 8, 24h nach Restimulation, gesammelt.

Die Proben wurden in Doppelbestimmungen analysiert und ELISA wurden nach der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Herstellers 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. Zu den jeweils verwendeten Reagenziensätzen siehe 3.x

3.4.2 Durchflußzytometrie im Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS):

3.4.1.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Zellen werden auf die Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen überprüft. Die Darstellung der Expression dieser Oberflächenmoleküle kann dabei unterschiedliche Zwecke verfolgen. Zum einen können durch die Färbung sogenannter Lineage Marker, also von Oberflächenmolekülen, die eine bestimmte Subpopulation von Zellen definiert, Zusammensetzung der Ausgangspopulation, Reinheit von Zellisolaten, Veränderungen und Verschiebungen der Zellzusammensetzung im Zuge von Stimulation oder Langzeitkultur überprüft werden. Zum anderen gibt es Oberflächenmoleküle, die bei Aktivierung oder Proliferation spezifisch vermehrt bzw. vermindert exprimiert werden. Eine Kontrolle dieser Moleküle kann also Aussagen über den funktionellen Zustand der Testpopulation ermöglichen.

Für eine FACS Färbung werden Zellen gewaschen und mit einem Fc-Block vorinkubiert, um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden, erneut gewaschen und anschließend mit dem jeweils gewünschten Antikörpermix bei 4 °C für 30 min inkubiert. Als Färbelösung wird dabei PBS 2% FKS verwendet. Nach erneutem Waschen werden die Zellen in 1 %

Paraformaldehyd Lösung fixiert und an dem Fluorescence Activated Cell Sorter, kurz FACS (EPICS XL Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) analysiert.

Antikörper gegen folgende Oberflächenantigene kamen dabei zum Einsatz:

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

Antikörper für die spezifischen Färbungen sind für die FACS Analyse mit verschiedenen Fluorochromen konjugiert, die anschließend im FACS Gerät durch Laser verschiedener Wellenlänge spezifisch angeregt werden können. Das so erzeugte Signal wird anschließend in Photozellen detektiert und kann rechnerisch analysiert werden.

Gängige Fluorochrome für die FACS Analyse sind beispielsweise R-Phycoerythrin (PE), Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und das Tandem Konjugat Cy-Chrome, das aus PE und einem Cyanfarbstoff besteht. Dabei wurden für weniger stark exprimierte Moleküle, wie zum Beispiel Aktivierungs- oder Proliferations-Marker, bevorzugt PE Konjugate verwendet, da diese ein stärkeres und stabileres Signal liefern und eine bessere Analyse zulassen.

3.4.1.2 Intrazelluläre Färbung

Zellen aus gemischter Lymphozytenkultur (siehe 3.2.2) wurden 8h nach Restimulation mit 5 µg/ml Brefeldin A (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) versetzt. Dadurch wird der Golgiapparat der Zelle gehemmt und so der Export von Zytokinen aus den Zellen verhindert. Nach 12-stündiger Inkubation mit Brefeldin A wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 % Formaldehydlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Auf einen erneuten Waschschrift folgte die Inkubation der Zellen für 10 min bei RT in 50 µl Saponin Puffer (siehe 3.1.1), um die Zellmembran durchlässig zu machen. Die Antikörper wurden in folgenden Konzentrationen verwendet.

Spezifität	Herkunft	Menge
Anti human für intrazelluläre Färbung	Pharmingen, San Diego, CA, USA	1 µl pro 50µl Färbung
Anti human Zelllinien Oberflächen Antigen (siehe 3.4.1.1)	Pharmingen, San Diego, CA, USA	3 µl pro 50µl Färbung

Anschließend wurden die Zellen mit 1ml Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Durchflußzytometers (Coulter EPICS XL) analysiert.

3.4.3 Überprüfung der Zytokintranskription mit Hilfe von Reverser Transkription (RT) und Polymerase Kettenreaktion (PCR)

3.4.3.1 Isolation der RNA

5×10^6 PBMZ wurden für 12h im Brutschrank stimuliert (siehe 3.1.1). Die Zellen bei 300g zentrifugiert und der Zelleniederschlag anschließend weiter aufbereitet. Dabei wurden zur Aufreinigung entweder TriFast (Peqlab, Erlangen, Deutschland) oder RNeasy (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Im Falle des RNeasy erfolgte der DNase Verdau während der Aufreinigung. Bei Verwendung von TriFast, wurde im Anschluß ein DNase Verdau mit DNase (GIBCO, Eggenstein, Deutschland) und anschließender Hochsalzfällung durchgeführt. Die gewonnene RNA wurde in 30 µl in DEPC Wasser aufgenommen.

3.4.3.2 Reverse Transkription

Durch Vermessung der RNA im Spektrophotometer bei 260 und 280 nm wurde die Konzentration der Proben festgestellt. Zur Reversen Transkription wurden je 3 µg RNA eingesetzt. RNA und Primer wurden für 3 min auf 70 °C erhitzt anschließend wurden auf Eis Puffer und dNTPs in Konzentrationen nach Herstellerangabe zugegeben. Die Reverse Transkriptase (RT) wurde zugegeben nachdem die Probe 1 min im Wasserbad bei 42 °C stand.

Reverse Transkription erfolgte für 1 h bei 42 °C, im Anschluß wurde die RT bei 95 °C für 5 min inaktiviert. Die cDNS wurde bei -20 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

3.4.3.3 Taq Man PCR zur Quantifizierung der cDNS Proben

Die Taq Man PCR wird zur Quantitativen PCR verwendet. Dabei gibt es zusätzlich zu den üblichen 5' und 3' Primern ein weiteres DNS Stück, das zwischen den Primern mit der DNS hybridisiert. Es wird als Probe bezeichnet und ist an zwei Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Dabei sind die beiden Moleküle so gewählt, dass sie sich an der Probe so benachbart befinden, dass bei Anregung des einen im Laserstrahl die Anregungsenergie durch Förster'schen Energietransfer auf den anderen übertragen wird und somit nicht als Fluoreszenz freiwerden

kann, also gequenched wird. Bei Vervollständigung des zweiten Stranges durch die Taq spaltet diese durch ihre Endonukleaseaktivität die Probe, so dass die beiden Farbstoffe getrennt von einander in Lösung sind und damit nach Laseranregung detektierbar werden.

Dieses Phänomen wird zunehmend für die sogenannte Real Time PCR verwendet, die einen direkten quantitativen Vergleich der mRNAs verschiedener Proben ermöglicht.

In dieser Arbeit wurde die Taq Man PCR auf ein Houskeeping Gen, die GAP-DH angewendet, um anschließend gleiche Mengen cDNS für die Detektion von IL15 in semiquantitativer PCR zu ermöglichen.

Primerspezifität	Sequenz	Konz.	Quelle
GAP-DH 3'	5' – TTG ACG GTG CCA TGG AAT TTG – 3'	25 pM	MWG, München, Deutschland
GAP-DH 5'	5' – ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC – 3'	25 pM	MWG, München, Deutschland
GAP-DH Probe	5'- CCT GGT CAC CAG GGC TGC TTT TAA – 3'	10 pM	Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA

Versuchsansatz

1µl Primer 5'
 1µl Primer 3'
 1µl Probe
 1µl dNTP10mM
 3µl MgCl₂ 25 mM
 3µl Reaktionspuffer (10x)
 1µl Taq Polymerase
 1µl cDNA
 ddH₂O ad 30µl

PCR Bedingungen

95 °C für 5 min
 30 Zyklen à:
 95 °C für 15 sec
 60 °C für 1 min

3.4.3.4 PCR zur Detektion von IL15 mRNA

Entsprechend der zuvor anhand Taq Man PCR festgestellten cDNS Konzentrationen, wurden gleiche Mengen für die semiquantitative Interleukin 15 PCR eingesetzt.

Primer wurden wie folgt verwendet:

Primerspezifität	Sequenz	Konz.	Quelle
Interleukin15 5'	5'-ATG AGA ATT TCG AAA CCA CAT TTG – 3'	50 pM	MWG, München, Deutschland
Interleukin15 3'	5'-CCA TTA GAA GAC AAA CTG TTG TTT GC-3'	50 pM	MWG, München, Deutschland

Versuchsansatz für IL15

1µl Primer 5'
 1µl Primer 3'
 1µl dNTP10mM
 6µl MgCl₂ 25 m
 1µl Taq Polymerase
 1µl cDNS
 5µl Reaktionspuffer (10x)
 +ddH₂O ad 50µl

PCR Bedingungen

94 °C für 3 min
 80 °C für Hotstart
 40 Zyklen à:
 94 °C für 45 sec
 55 °C für 30 sec
 72 °C für 1 min
 Abschluß:
 72 °C für 10 min
 4 °C

Versuchsansatz für GAP-DH

1µl Primer 5'
 1µl Primer 3'
 1µl dNTP10mM
 5µl MgCl₂ 25 m
 1µl Taq Polymerase
 1µl cDNS
 5µl Reaktionspuffer (10x)
 +ddH₂O ad 50µl

PCR Bedingungen

94 °C für 3 min
 80 °C für Hotstart
 40 Zyklen à:
 94 °C für 45 sec
 58 °C für 30 sec
 72 °C für 1 min
 Abschluß:
 72 °C für 10 min
 4 °C

Das PCR Produkt wurde anschließend auf ein 1,5% Agarose aufgetragen und mit Ethidiumbromid in UV Licht sichtbar gemacht.

3.4.3.5 CTLL-2 Assay zur Detektion von IL-15 im Zellüberstand

PBMZ wurden, wie unter 3.2.1 und 3.3.1 beschrieben, präpariert und in Kultur genommen. Dabei wurden verschiedene Stimuli zur Inkubation zugegeben. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Überstände gewonnen. Diese wurden auf ihre Fähigkeit überprüft, IL-2 abhängige CTLL-2 Zellen zur Proliferation zu bringen.

Dazu wurden CTLL-2 Zellen folgendermaßen vorbereitet. Die Zellen wurden 2d vor dem Assay das letzte Mal umgesetzt, damit möglichst wenig IL-2 im Medium übrig sein konnte. Sie wurden geerntet und vor Verwendung 2 x gewaschen. Anschließend wurden sie in einer Konzentration von 15 000 Zellen / Loch auf eine 96-Loch Flachbodenplatte aufgebracht und mit Überständen der PBMZ Stimulation überschichtet. Eine Titration von IL-2 wurde als Positivkontrolle und reines Medium als Negativkontrolle aufgebracht. Um genauere Ergebnisse zu erzielen erfolgte für die Zellüberstände mindestens 6-fach Bestimmung. Die Zellen wurden anschließend für 24 h im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Als weitere Vorsichtsmaßnahme wurden zu den Versuchsansätzen blockierende Antikörper für IL-2 und IL-4 zugegeben, weil beide Zytokine Proliferation von CTLL-2 Zellen verursachen. Zusätzlich wurden die Zellüberstände im ELISA auf das Vorhandensein IL-2 und IL-4 überprüft. Beide Zytokine konnten nicht im Überstand nachgewiesen werden.

Nach 24 h Inkubation wurden MTT in einer Konzentration von 2,5 mg/ml zugegeben und wiederum für 2 ½ Stunden inkubiert. Danach wurde HCl- Isopropanol hinzugefügt und die Absorption im Photometer bei 560 nm gegen 690 nm gemessen.

3.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Für die statistische Auswertung der einzelnen Versuche wurde der Student t Test verwendet.

P < 0.05 wurde als statistisch signifikant definiert.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der geeigneten Testzellpopulation

Für die Untersuchung der Bedeutung oligoinduzierter Zytokine, insbesondere Typ I Interferon, wurden verschiedene funktionelle Assays eingesetzt, deren Ausgangsbasis eine PBMZ in vitro Kultur darstellte. Verschiedene Vorversuche ergaben dabei, daß sich frisch gewonnenes Blut freiwilliger gesunder Spender am besten für diesen Zweck eignete. Allerdings wurden meist größere Mengen an Spenderzellen benötigt, weshalb aus Gründen der Zumutbarkeit meist auf Buffy Coats von Eigenblutspenden zurückgegriffen werden mußte. Eine möglichst baldige und frische Bearbeitung erwies sich dabei als günstig; da sich selbst bei kürzerer Lagerung starke Verschiebungen in der Zellzusammensetzung feststellen ließen. Bei Aufbewahrung der Buffy Coats über Nacht wurde die Monozyten-/Makrophagenfraktion z.B. auf weniger als 40% des Ausgangswertes verringert. Deshalb wurden für die im Folgenden geschilderten Versuche, soweit nicht anders angegeben, Buffy Coats aus dem benachbarten Krankenhaus direkt nach der Herstellung verwendet.

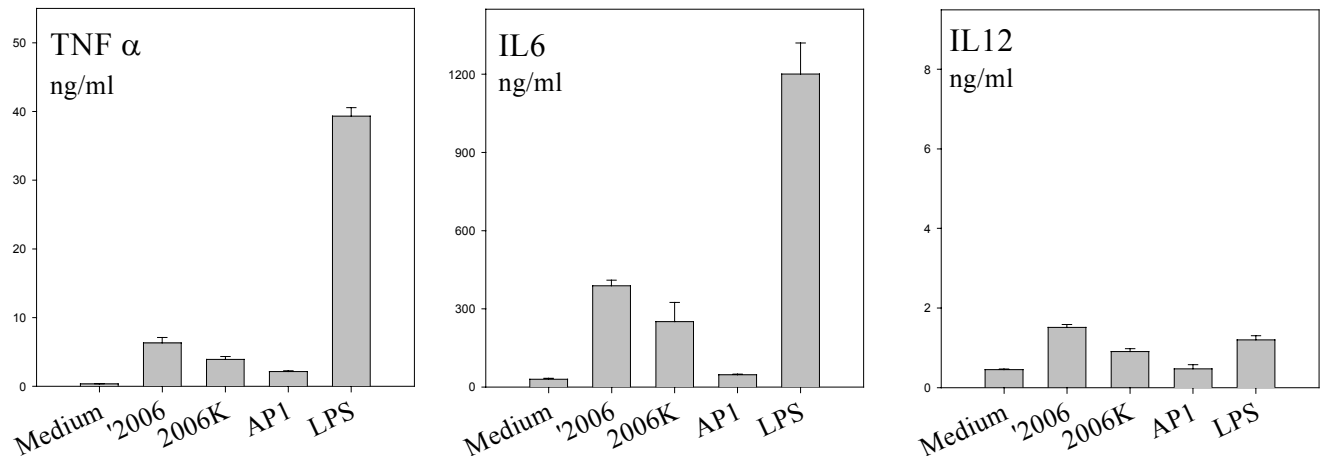
4.2 Verhalten humaner PBMZ bei ODN Stimulation in einfacher in vitro Kultur

Über die Wirkung von Oligonukleotidstimulation auf das Immunsystem wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Artikel veröffentlicht, die eine Anwendbarkeit in der Humanmedizin z.B. als Adjuvans (38) oder in der Tumorthherapie(54) durchaus denkbar erscheinen lassen. Die meisten Daten stammen allerdings noch immer aus Mausmodellen. Anliegen dieser Arbeit war es daher, zu versuchen, anhand funktioneller Assays in vitro zu analysieren, inwieweit diese Erkenntnisse aus Tiermodellen auf das humane System übertragbar sind.

Zunächst wurde das Zytokinprofil untersucht, das humane PBMZs in vitro nach Oligonukleotidstimulation produzieren. Dazu wurden PBMZs aus Buffy Coats in Kultur genommen. Mit Oligonukleotid stimuliert produzierten die PBMZs dabei IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α (vgl. Abb. 4.2.1), Typ I Interferon (vgl. Abb. 4.2.2), IL-4, IL-10. In Abbildung 4.2.1 und 4.2.2 ist die Zytokinproduktion humaner PBMZ Kultur nach ODN 2006 Stimulation graphisch dargestellt. Dabei wird der Effekt von 2006 mit einer Negativkontrolle aus reinem Medium, dem GC Inversions-Kontroll-ODN 2006K, AP1, einem ODN ohne CpG Motiv und den Positivkontrollen LPS und Poly(I:C) verglichen. Es kann für Stimulation mit 2006 eine

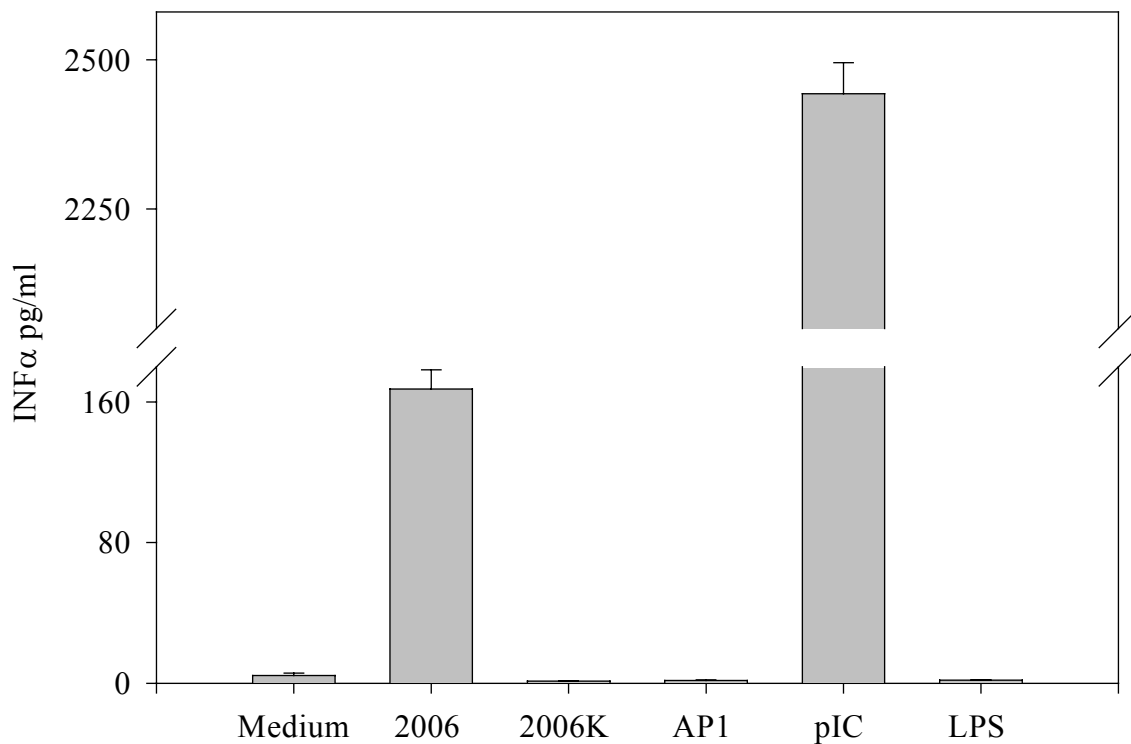
Steigerung der Zytokinproduktion gezeigt werden, die mit zunehmender Veränderung des Motivs verschwindet. Die produzierten Zytokinmengen erscheinen im Vergleich mit LPS teilweise gering, sind aber dennoch in einem biologisch bedeutsamen Bereich.

Abbildung 4.2.1:



Legende 4.2.1: PBMZ wurden in 24-Lochplatten zu 5×10^6 in einem Millimeter Medium in Kultur genommen und mit ODN 2006, 2006K, AP1 je $2 \mu\text{M}$ und LPS $100 \mu\text{g/ml}$ stimuliert. Zytokinkonzentrationen wurden nach 8h für TNF α bzw. nach 24h für IL6 und IL12 im ELISA bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von fünf. Standardabweichung aus Mehrfachbestimmung im ELISA.

Abbildung 4.2.2:



Legend zu Abb. 4.2.2: 5×10^6 PBMZ pro Ansatz und ml wurden in 24-Lochplatten mit unterschiedlichen ODN, polyI:C und LPS in Kultur genommen. 24h später wurden mit ELISA Zytokine im Überstand bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment, Standardabweichung gibt Abweichung von Mehrfachbestimmung im ELISA wieder.

Bei Betrachtung der Zellen im FACS konnte eine vermehrte Expression kostimulatorischer Marker, wie CD80, CD86, CD40 und von MHC Klasse I und II Molekülen beobachtet werden (Daten nicht dargestellt). 24h Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden führt also zu einer Aktivierung von humanen PBMZs: Eine gesteigerte Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle ist Ausdruck einer verbesserten Zell-Zell-Interaktion und die beschriebene Zytokinproduktion insbesondere von Typ I Interferon und IL12 schafft ein Milieu, das v. a. Th-1 Immunantworten favorisiert. Die folgenden Versuche sollen besonders die Wirkung der Zytokinproduktion näher betrachten.

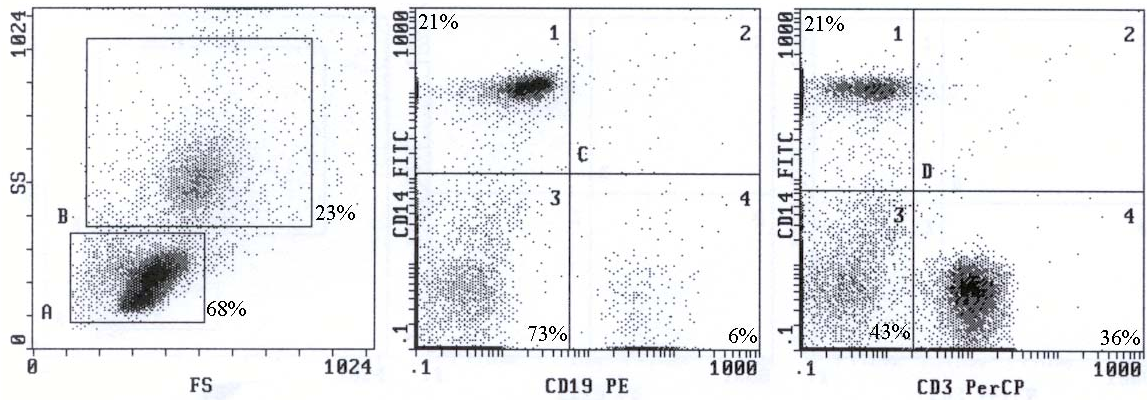
4.3 Die Bedeutung von CD40 Ligand und T-Zell-Kostimulation für die Wirksamkeit von CpG-Oligonukleotiden

Im Immunsystem werden häufig zwei verschiedene Signale benötigt, bevor eine Antwort eingeleitet wird. T-Zellen reagieren z.B. nicht auf T-Zell-Rezeptor (TZR) Stimulation allein, sondern werden erst aktiv, wenn sie ein zweites Signal durch CD28 (1;20) erhalten. Genauso fungieren aber auch T-Zellen als Kostimulatoren für andere Zellen, indem sie beispielsweise durch CD40 Ligand CD40 Interaktion ein 2. Signal liefern (57).

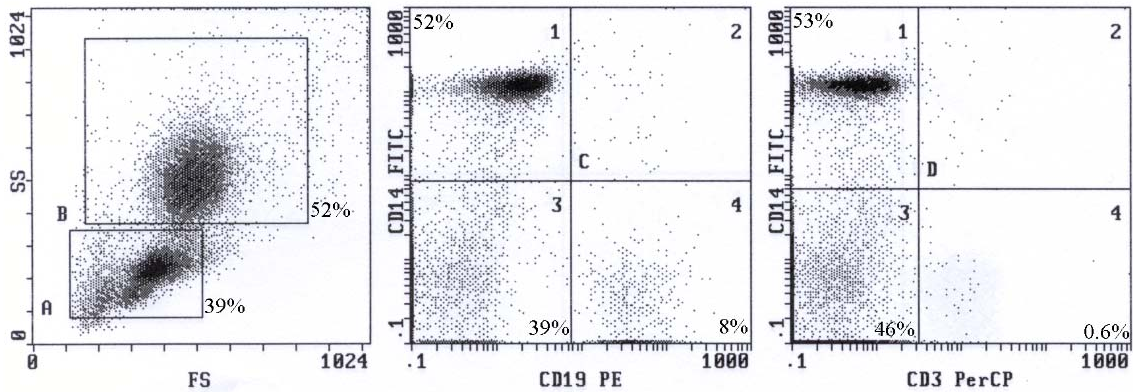
Angesichts der oben geschilderten Zytokinproduktion von IL6, IL12, TNF- α , für die vornehmlich Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen verantwortlich gemacht werden, stellte sich die Frage, inwieweit die Hilfe von T-Zellen für die Induktion der Zytokinproduktion nötig ist oder ob sie durch z.B. CD40Ligand ersetzt werden kann. Dazu wurden PBMZs in zwei Fraktionen geteilt. Die eine wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, nach Dichtezentrifugation in Kultur genommen. In der anderen Fraktion wurden zuvor T-Zellen durch Rosettierung mit Schafserythrozyten abgetrennt. Die Reinheit der so gewonnenen Population wurde mittels FACS Färbung überprüft (Abb. 4.3.1). In der Restpopulation konnten CD 3 positive T-Zellen bis auf 0,6% eliminiert werden.

Abbildung 4.3.1

Zellzusammensetzung der PBMZs vor Auftrennung



Zellzusammensetzung nach Abtrennung der T-Zellen mit Schafserythrozyten E-minus

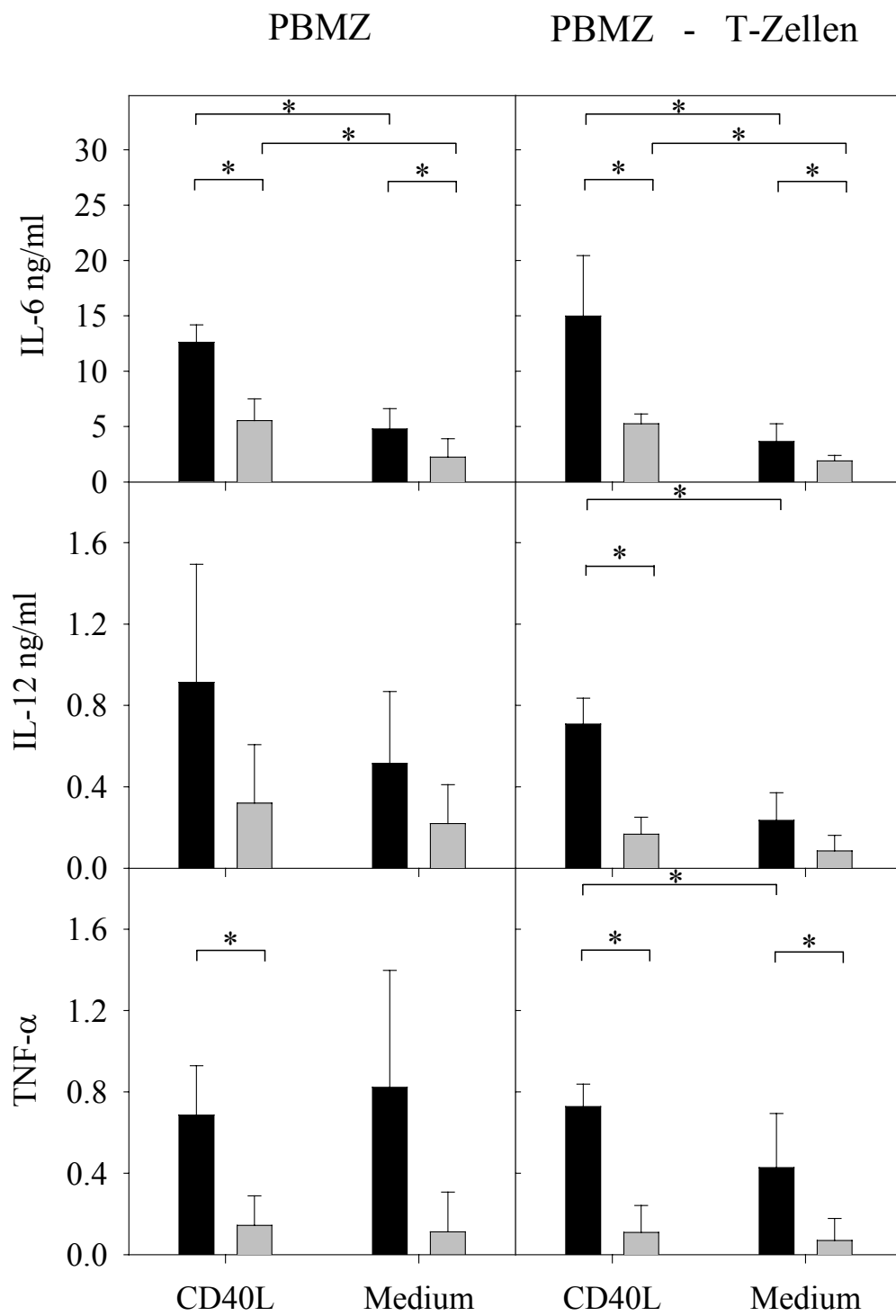


Legende Abb.4.3.1:

PBMZ wurden mit Hilfe von Dichtezentrifugation isoliert und anschließend mit AET aktivierten Schafserythrozyten inkubiert. In einem weiteren Dichtezentrifugationsschritt wurden dann die aufgrund des CD2 Moleküls mit Schafserythrozyten kreuzreagierenden T-Zellen von den übrigen PBMZ abgetrennt.

Anschließend wurden die Zellen 24h mit ODN stimuliert, wobei jeweils ein Ansatz mit CD40 Ligand transfizierten Fibroblasten kokultiviert wurde und der andere nicht. Abbildung 4.3.2 zeigt das Ergebnis.

Abbildung 4.3.2:



Legende zu Abb. 4.3.2: 2×10^6 /ml PBMZ bzw. PBMZ nach T-Zell Depletion wurden über 24h in 24-well Kulturplatten nicht (graue Balken) oder mit ODN 2006 2.5 μ M stimuliert (schwarze Balken), dabei wurde ein Teil der Zellen mit γ -bestrahlten CD40L transfizierten Fibroblasten 100000/well kokultiviert. Nach 24h wurden mittels ELISA Zytokin Konzentrationen im Überstand bestimmt. Werte repräsentieren Mittelwert + Stabw. aus 5 unabhängigen Experimenten mit * kennzeichnen Signifikanz. Die Zytokinproduktion der Ansätze nach T-Zell Depletion wurden entsprechend der relativen Zunahme an Effektorzellen normalisiert!

Bei Betrachtung der Grafik lassen sich mehrere Aussagen treffen:

ODN Stimulation kann, wie bereits gezeigt, die Zytokinproduktion signifikant steigern. Dieser Effekt besteht sowohl in Gegenwart der transfizierten Fibroblasten als auch auf PBMZ Kultur allein.

Die Gegenwart von T-Zellen ist für die Produktion von Zytokinen nicht notwendig, da auch in der T-Zell depletierten Kultur, sowohl in Gegenwart der Fibroblasten als auch ohne diese Zytokin produziert wird. Signifikanz der jeweiligen Vergleichsbedingungen ist durch einen Stern auf dem Vergleichsbalken angegeben. Bei hohen interindividuellen Schwankungen in der Zytokinproduktion waren für IL-12 und TNF- α Produktion die Wiederholungszahlen nicht hoch genug, um signifikante Ergebnisse erzielen zu können.

CD40 Ligation hat einen Einfluss auf die Zytokinproduktion in beiden Testsituationen. Signifikanz ist auch hier durch Stern über dem jeweiligen Vergleichsbalken angegeben. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Testsituation mit und ohne T-Zellen im Versuchsansatz lässt sich nicht zeigen.

4.4 Wirkung der ODN induzierten Zell-Aktivierung auf T-Zell-Funktionen

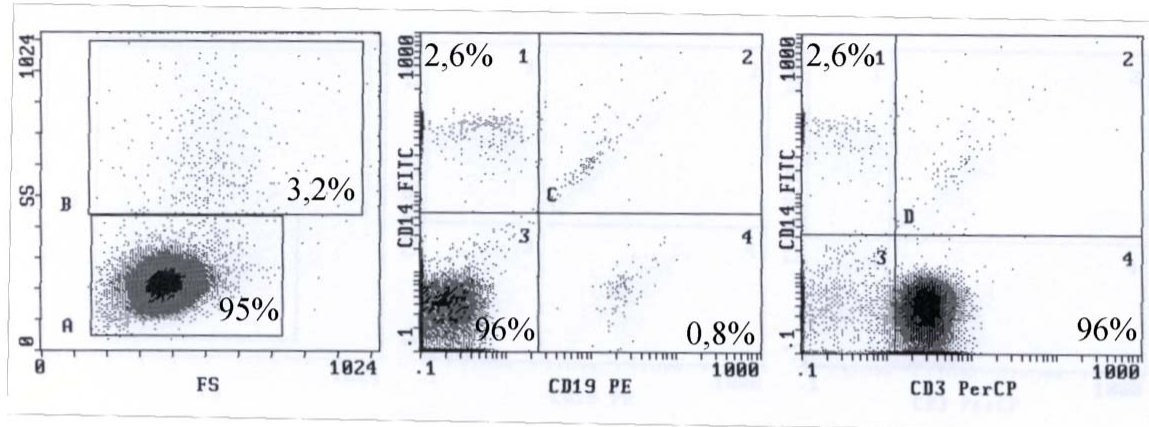
Bisher wurde die Wirkung von ODN auf die Zytokinproduktion und Aktivierung von PBMZ dargestellt und die Bedeutung von Zell-Zell Interaktionen für die Stimulierbarkeit von am Beispiel der CD40 Ligation und T-Zell Depletion allgemein angeschnitten. Die ODN induzierten Zytokine beeinflussen im Mausmodell entscheidend Zell-Zell Interaktionen und favorisieren bei der beispielsweise die Entstehung bei Stimulation mit Antigen und ODN einer Th-1 Antwort(40). Im Folgenden soll der Einfluß der ODN induzierten Zytokine auf die T-Zell Differenzierung im humanen System in vitro dargestellt werden.

4.4.1 Modell der Gemischten Lymphozytenkultur zur Beschreibung der ODN Wirkung auf funktionelle T-Zell Antworten

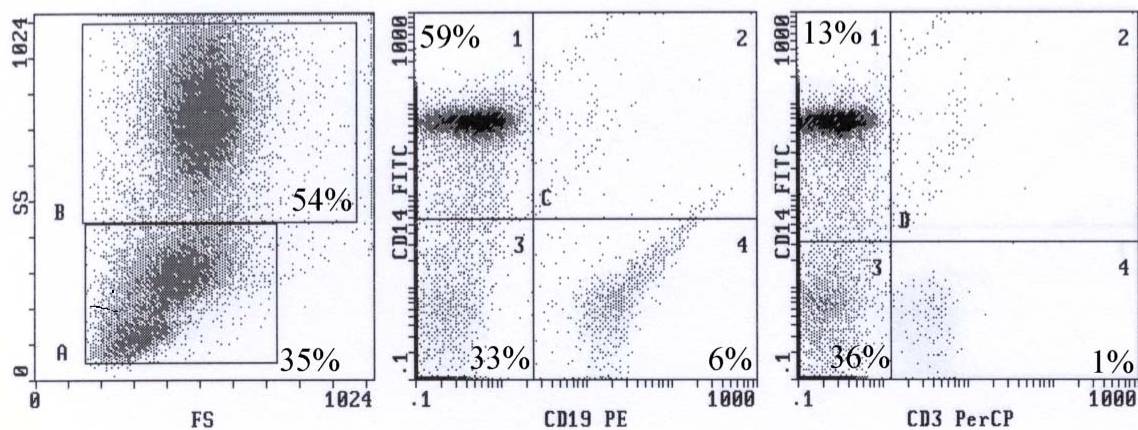
Als Modell einer T-Zell Stimulation wurde eine Gemischte Lymphozytenkultur gewählt, wobei der fremde MHC Komplex auf den APZ des einen Spenders als T-Zell Rezeptor Stimulus für die T-Zellen des anderen Spenders dient. Zur Aufreinigung der Testzellpopulationen wurden PBMZ zweier Buffy Coat Spender mit Hilfe von Schafserythrozyten jeweils in zwei Fraktionen aufgetrennt. Die Fraktion, die auf der Oberfläche CD 2 exprimierte und infolge dessen mit den Schafserythrozyten reagierte, wurde als T-Zell Population betrachtet und die Reinheit mittels FACS Analyse überprüft. Die Fraktion, die nicht mit den Schafserythrozyten reagierte und somit frei von T-Zellen war, wurde als Antigen präsentierende Zellen (APZ) bezeichnet. Zur jeweiligen Zellzusammensetzung siehe Abb. 4.4.1.1.

Abbildung 4.4.1.1

"T-Zellen" Spender A - mit Schafserythrozyten rosettiert



"APZ" Spender B - PBMZ nach Depletion der T-Zellen mit Schafserythrozyten



Legende zu Abb. 4.4.1.1: PBMZ aus Eigenblutspenden wurden mit AET aktivierten Schafserythrozyten koinkubiert und anschließend durch Dichtezentrifugation in eine, mit den Schafserythrozyten Rosetten bildende, T-Zellfraktion und die übrig bleibenden Antigen präsentierenden Zellen aufgetrennt. T-Zell Gehalt der T-Zell Fraktion und der APZ wurden im FACS überprüft.

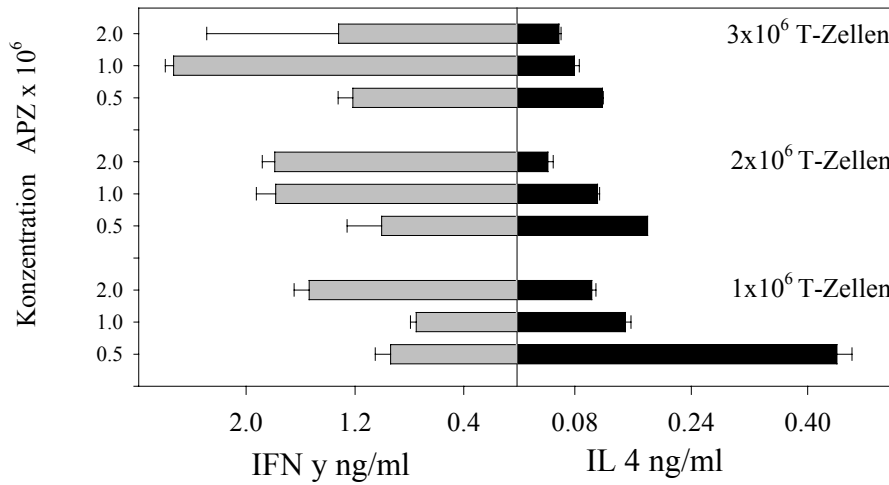
Nach der Rosettierung bestanden die T-Zellen zu 96% aus CD3 positiven, während CD3 positive unter den APZ nur noch 1% ausmachten. Die gewonnenen Testzellpopulationen waren also ausreichend rein und für den Versuch gut geeignet.

Im Anschluß wurden die T-Zellen eines Spenders mit den APZ des anderen Spenders in Kokultur genommen und mit verschiedenen Zusätzen stimuliert. Am Tag drei wurden die Zellen gewaschen, umgesetzt und für eine Woche mit IL2 10 U/ml expandiert, um am Tag 8 mit anti CD3 restimuliert zu werden. IFN γ - und IL4 Produktion wurden daraufhin mittels ELISA und intrazellulärer FACS Analyse (Daten nicht dargestellt) untersucht. Eine Erhöhung der IFN- γ Produktion wurde in Kombination mit einem Rückgang der IL 4 Produktion als Hinweis auf eine T-Zell Entwicklung im Sinne einer Th-1 Differenzierung betrachtet, während IL-4 Anstieg mit IFN- γ Rückgang entsprechend Th-2 Differenzierung anzeigt.

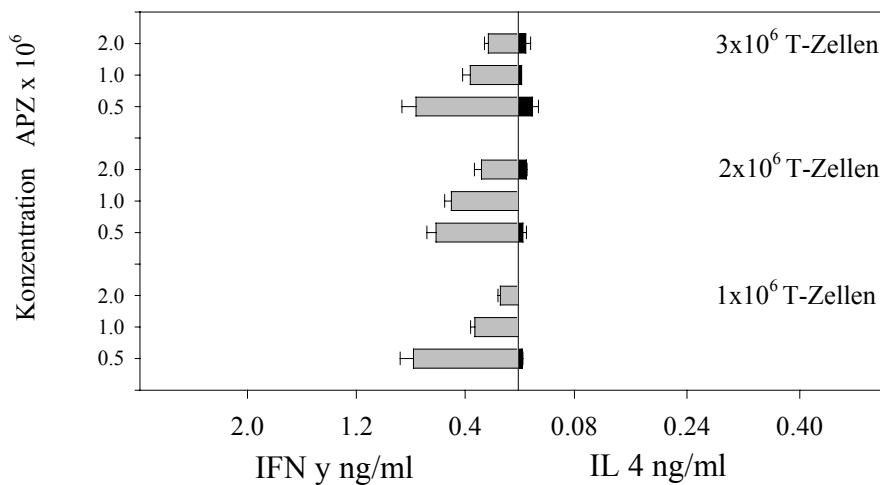
Zunächst wurden unterschiedliche Konzentrationen von APZ und T-Zellen gegeneinander titriert, um optimale Versuchsbedingungen festzulegen. Dabei zeichnete sich ab, daß die Spenderzellen sehr verschieden auf den fremden MHC Stimulus reagieren (siehe Abb. 4.4.1.2). Der Einfluss der Zellkonzentrationen war im Vergleich dazu gering. Im Folgenden wurden für die Versuche 1×10^6 APZ und $2 - 3 \times 10^6$ T-Zellen eingesetzt. Es blieb abzuwarten, ob Stimulation durch den Zusatz unterschiedlicher Zytokine und ODN angesichts der hohen interindividuellen Schwankungen ausreichen große Veränderungen hervorrufen würden, um trotz dieser hohen Variabilität definitive Aussagen über den Einfluß des jeweiligen Stimulationsprotokolls treffen zu können.

Abbildung 4.4.1.2

Spender B versus Spender A



Spender A versus Spender B



Legende zu Abb. 4.4.1.2:

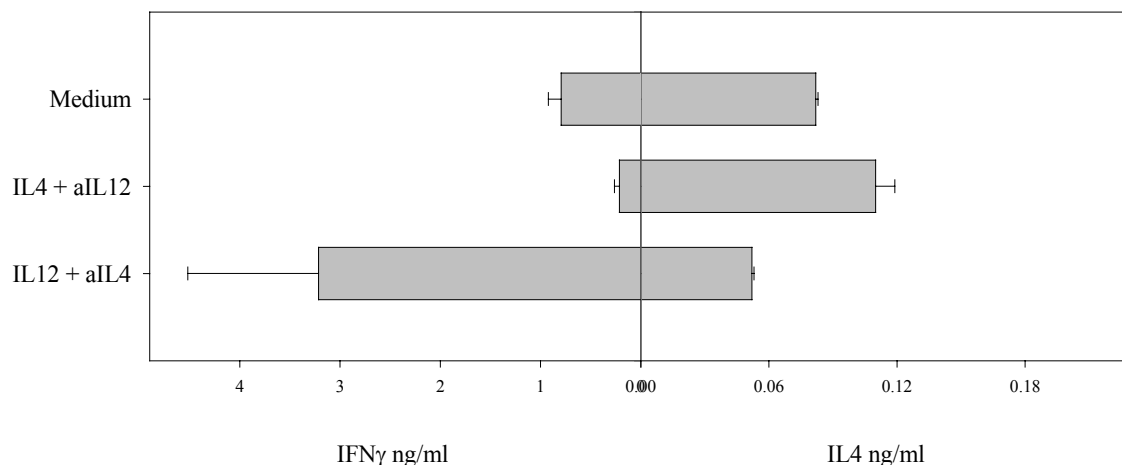
PBMZ zweier Eigenblutspender wurden, wie oben beschrieben, in jeweils eine T-Zell Fraktion und eine Fraktion APZ aufgetrennt. Anschließend wurden die beiden Testpopulationen kreuzweise gegeneinander titriert, so daß jeweils 3, 2, oder 1x10⁶ T-Zellen eines Spenders mit 2, 1 oder 0,5x10⁶ APZ des anderen in Kultur kamen. Die Versuche wurden in 24-Lochplatten in einem ml Medium durchgeführt.

4.4.2 Zytokin Induktion einer T-Zell Differenzierung

Eigentliches Ziel der Untersuchung war es, festzustellen, ob ODN Stimulation auch im humanen in vitro System eine Th-1 gerichtete Antwort hervorrufen kann. Es war deshalb nötig, ein übliches T-Zell Differenzierungsprotokoll im System der gemischten Lymphozytenkultur zu testen, um eine generelle Eignung des Modells für diese Fragestellung zu bestätigen. Dazu wurden, wie oben beschrieben, T-Zellen eines Spenders zu APZ des anderen Spenders in Kultur gesetzt. Für eine Th-1 Stimulation wurden IL-4 blockierende Antikörper und IL-12 ins Medium gegeben, während für eine Th-2 Entwicklung IL-12 blockierende Antikörper und IL-4 eingesetzt wurden.

Das in Abb.4.4.2 dargestellte Ergebnis, bestätigt, daß eine gemischte Lymphozytenkultur zu T-Zell Differenzierungsversuchen herangezogen werden kann.

Abbildung 4.4.2



Legende zu Abb. 4.4.2: PBMZ zweier Donoren wurden, wie beschrieben, in T-Zellen und APZ aufgetrennt. Dabei wurden 2×10^6 T-Zellen des jeweils einen Spenders mit 1×10^6 APZ des anderen Spenders in 1 ml Medium pro 24 Loch-Platten gesetzt. Sie wurden durch Zugabe von IL4 10 ng/ml und IL12 blockierenden Antikörpern 2 μ g/ml im Sinne einer Th-2 Differenzierung stimuliert, durch Zugabe von IL4 blockierenden Antikörpern 200 ng/ml und IL12 2 ng/ml im Sinne einer Th-1 Differenzierung. Standardabweichung aus Dreifachbestimmung im ELISA.

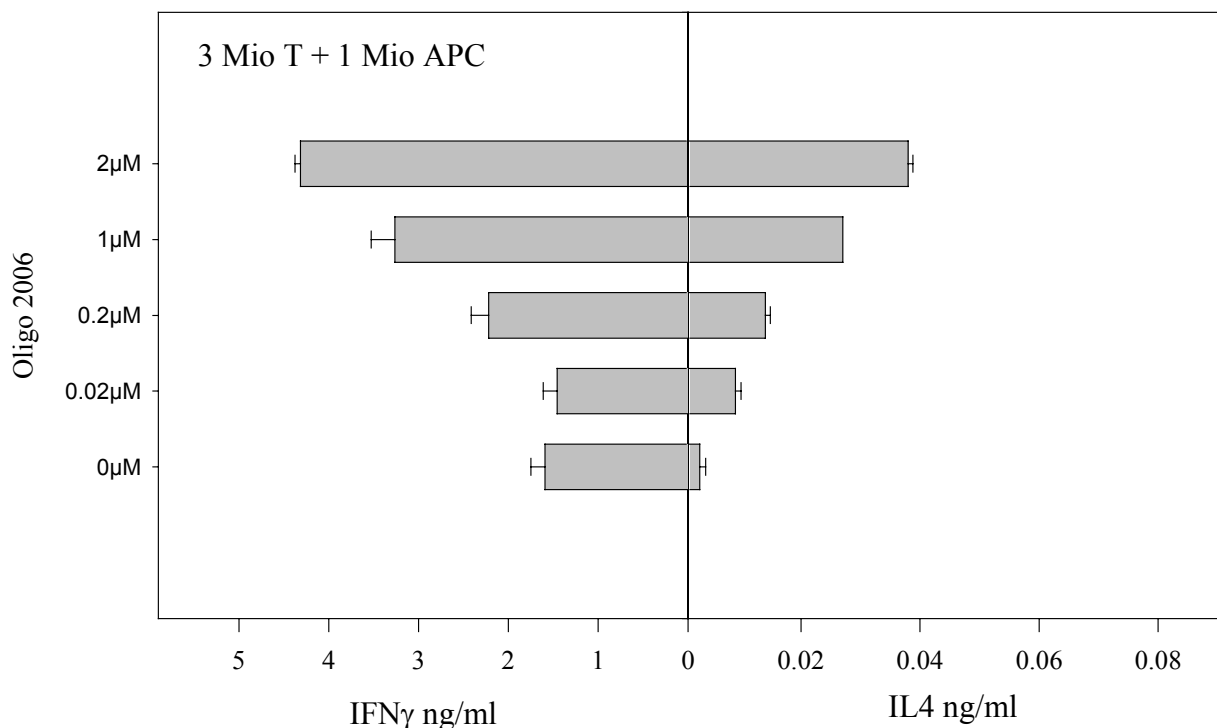
Bei Analyse der Ergebnisse kann man folgende Aussagen treffen. In reiner MLR produzieren PBMZ eine geringe Menge IL-4 und IFN- γ . Beeinflusst man die MLR zu Anfang, indem man IL-12 und anti IL-4 hinzu gibt, dann wird mehr IFN- γ und weniger IL-4 produziert. Es findet also eine Verschiebung der Zytokinproduktion in Richtung Th-1 statt. Das Gegenteil findet

man, wenn IL-4 und anti IL-12 zugesetzt werden. Dann wendet sich die Zytokinproduktion in Richtung Th-2 und es wird mehr IL-4 und weniger IFN- γ produziert.

4.4.3 Effekt von ODN Stimulation in der Gemischten Lymphozytenkultur

Um nun den Effekt von ODN Stimulation auf das Modellsystem zu untersuchen, wurde der oben geschilderte Versuch noch einmal durchgeführt. Die zuvor zur Stimulation verwendeten Zytokine wurden durch Oligo ersetzt und zum besseren Verständnis des Modells wurde Oligo in mehreren Konzentrationsstufen titriert.

Abbildung 4.4.3:



Legende zu Abb. 4.4.3: PBMZ zweier Spender wurden jeweils in eine T-Zell- und eine APZ-Fraktion aufgetrennt. Anschließend im Sinne einer gemischten Lymphozytenkultur zu je 3×10^6 T-Zellen und 1×10^6 APZ zusammengesetzt und mit 0; 0,02; 0,2; 1; 2 μ M 2006 stimuliert. Die Zellen wurden an Tag 3 gewaschen, umgesetzt und anschließend für 7 Tage mit 10 U/ml IL2 expandiert. An Tag 7 erfolgte eine Restimulation mit 1 μ g/ml anti-CD3 von je 1000000 Zellen in 96-Lochplatten. ELISA Daten und Standardabweichung stammen aus Dreifachbestimmungen und zeigen ein repräsentatives Experiment von vier unabhängigen Untersuchungen.

Bei Analyse des Versuches kann man einen dosisabhängigen Effekt von ODN auf die gemischte Lymphozytenkultur feststellen. T-Zell Zytokine werden dosisabhängig vermehrt gebildet, allerdings kommt es zu einer Zunahme sowohl der IL-4 als auch IFN- γ Produktion,

die Favorisierung einer Th-1 Zytokin-Antwort kann in diesem Modell also nicht gezeigt werden.

Bei weiterer Auseinandersetzung mit dem Modell der gemischten Lymphozytenkultur wurde zunehmend klar, dass in dem gewählten Versuchsansatz zum einen die unterschiedliche Reaktionsbereitschaft auf den Fremd-MHC-Komplex einen zu großen Einflussfaktor darstellte.

Auch intrazelluläre FACS Färbung zur Untersuchung der IFN- γ Produktion konnten zwar einen Zuwachs an IFN- γ zeigen, doch interindividuelle Unterschiede waren sehr groß und standen der genaueren Analyse des Phänomens im Wege.

Für zukünftige Untersuchungen stand ein Modell mit plasmazytoiden IL3-R α positiven dendritischen Zellen und naiven T-Zellen in Aussicht. Es wurde von Vanessa Redecke weiter geführt(7). Die gemischte Lymphozytenkultur wurde deswegen als Modell verlassen und das Augenmerk auf ein anderes Wirkungsfeld durch ODN induzierten Zytokine gerichtet.

Mit ihrem Einfluss auf die Zytokinproduktion beeinflussen ODN ganz entscheidend auch Effektorfunktionen der innten Immunität – schließlich waren es Steigerungen der Zytotoxizität von NK-Zellen gewesen, die ursprünglich zur Entdeckung der ODN geführt hatten. Im Folgenden sollte der Mechanismus der NK-Zell Aktivierung näher untersucht und erklärt werden.

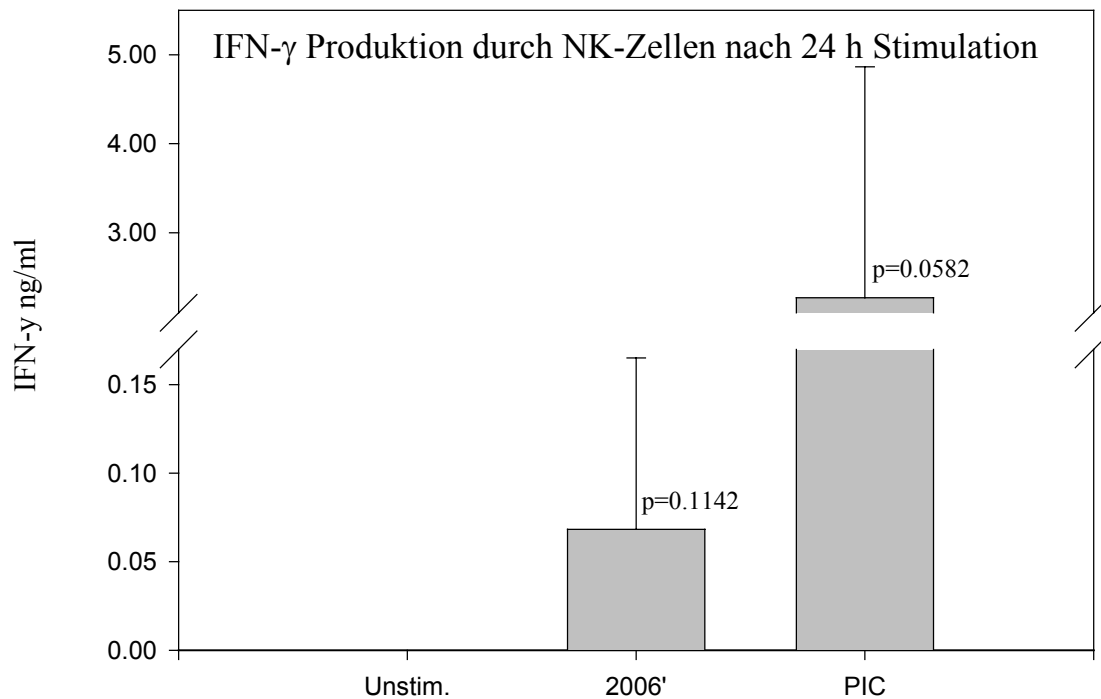
4.5 Einfluß CpG reicher Oligonukleotide auf die NK Zell Funktion

CpG reiche ODN stimulieren die NK Zell Aktivität(3;29), dies ist hinlänglich bekannt und einer der ersten beschriebenen Effekte der ODN. Stimulation von NK Zellen kann sich anhand verschiedener Phänomene manifestieren. Zum einen in der Zytokinproduktion durch NK Zellen, weiterhin in einer gesteigerten Expression von Zelloberflächenmolekülen und am deutlichsten in der Steigerung der zytotoxischen Aktivität. Im Folgenden wurde versucht in vitro im humanen System die geschilderten Effekte zu reproduzieren und den dahinter stehenden Wirkmechanismus der ODN aufzudecken.

4.5.1 Steigerung der NK-Zell IFN- γ Produktion

Bei Stimulation von PBMZ in vitro mit ODN kann man nach 18 – 48 h IFN- γ Produktion im Zellüberstand nachweisen. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass IFN- γ unter diesen Bedingungen von NK-Zellen und nicht etwa T-Zellen hergestellt wird (29). Um die Mechanismen der Aktivierung von NK-Zellen durch ODN 2006 näher zu untersuchen, wurden PBMZ wie unter 3.3.1 beschrieben in Kultur genommen und mit 2006 oder polyI:C stimuliert. Überstände wurden nach 24h gewonnen und im ELISA analysiert (vgl.3.4.1). Dabei stellte sich eine Steigerung der IFN- γ Produktion für beide Stimuli dar, die sich in beiden Fällen durch Zugabe von Typ 1 IFN blockierenden Antikörpern unterdrücken ließ (Daten nicht dargestellt). Da der induzierbare Effekt im Falle von 2006 allerdings äußerst gering ausfiel, war dieses Modell zur weiteren Aufklärung des Aktivierungsmechanismus nicht geeignet.

Abbildung 4.5.1:



4.5.1 Legende: PBMZ wurden in 24-Lochplatten zu 2×10^6 in einem Milliliter Medium in Kultur genommen und mit ODN 2006 $2 \mu\text{M}$ und polyI:C $25 \mu\text{g/ml}$ stimuliert (vgl. 3.3.1). Zytokinkonzentrationen wurden nach 24h für IFN- γ im ELISA bestimmt (vgl. 3.4.1). Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus Ergebnissen von sechs verschiedenen Spendern mit unterschiedlicher Responsivität.

4.5.2 Wirkung von CpG ODN auf die Expression von Zelloberflächenmolekülen von NK-Zellen

Es ist beschrieben, dass NK-Zellen nach Aktivierung CD69 und CD71 auf der Zelloberfläche exprimieren. Anhand mehrerer Stimulationsversuche wurde geprüft, inwiefern sich Aktivierung der CD16/CD56 positiven NK-Zell Population mit Hilfe von CD69 und CD71 Oberflächenfärbungen untersuchen lässt. Leider waren die Veränderungen der Ausgangspopulation von CD16/CD56 positiven nach Stimulation so groß, dass es nicht gelang die Expression der genannten Marker ausreichend gut zu verfolgen (Daten nicht gezeigt).

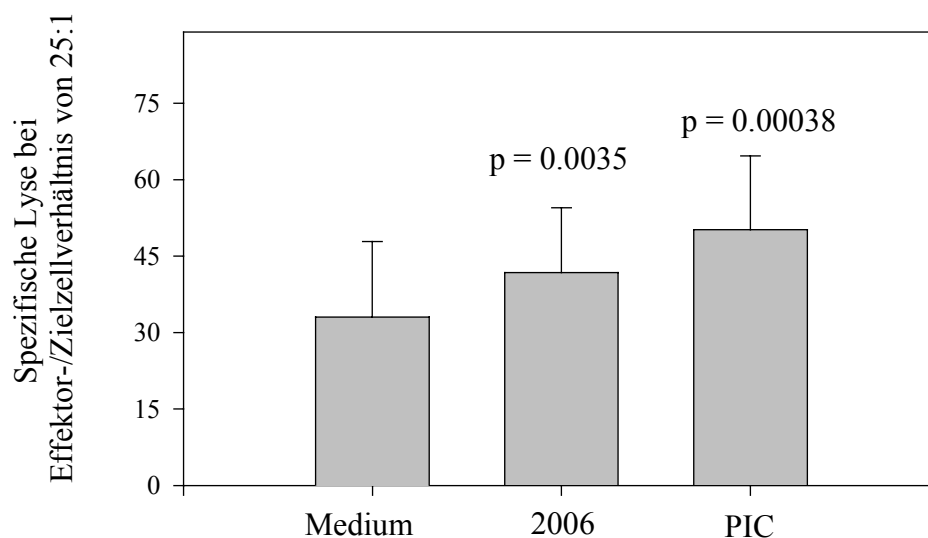
Es blieb also die NK-Zell Zytotoxizität für weitere Versuche.

4.5.3 NK Zell Zytotoxizitätsassay

PBMZ wurden wie unter 3.2.1 isoliert und für 24h mit verschiedenen Stimuli für 24h in Kultur genommen. Anschließend wurden sie in Koinkubation mit Zielzellen wie unter 3.3.3.1 beschrieben auf ihre zytotoxische Aktivität untersucht. Dabei wurden unterschiedliche Zielzellen eingesetzt (vgl. 3.1.5). K-562 werden üblicherweise zur Untersuchung der natürlichen Zytotoxizität von NK Zellen verwendet. Sie besitzen keinen MHC Komplex und werden deswegen von NK Zellen erkannt und lysiert. Daudis dienen häufig als Kontroll-Zielzellen, allerdings exprimiert die Zelllinie kein β_2 -Mikroglobulin und ist demnach ebenfalls gegenüber NK Zellzytotoxizität sensibel. Deshalb wurden zusätzlich B-721 Zellen als Kontrolle verwendet, die als B-Zell-Lymphom mit weitgehend normalem Phänotyp gegen NK Zell Zytotoxizität unempfindlich sind.

In den folgenden Abbildungen 4.5.3.1 – 4.5.3.3 ist die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegen K562, Daudi und B-721 nach Stimulation dargestellt.

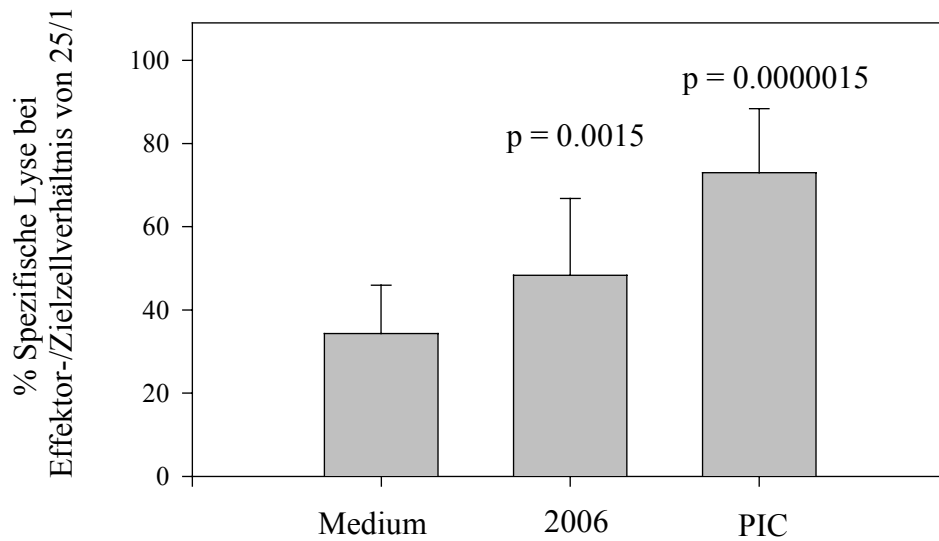
Abbildung 4.5.3.1: Zytotoxische Aktivität von humanen PBMZ auf K562 Zielzellen



Legende:

PBMZs wurden über 24h stimuliert. Anschliessend wurde in 4h Cr-51 Release Assay die zytotoxische Aktivität bestimmt. Werte zeigen den Mittelwert aus vierzehn unabhängige Experimenten mit unterschiedlichen Donoren. Zellen wurden in 24-Lochplatten in 1ml Med im Brutschrank mit $2\mu\text{M}$ 2006 oder $50\mu\text{g/ml}$ PIC inkubiert.

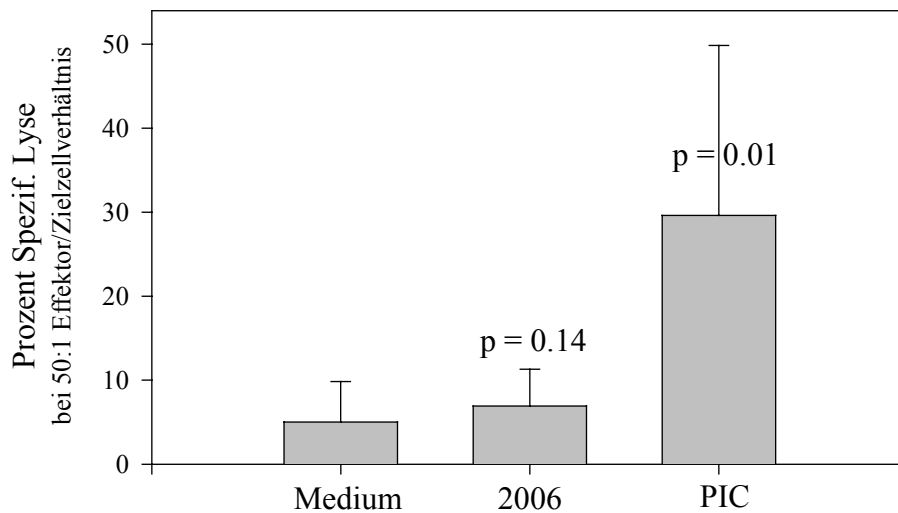
Abbildung 4.5.3.2: Zytotoxische Aktivität von humanen PBMZ auf Daudi Zielzellen



Legende:

PBMZs wurden über 24h stimuliert. Anschliessend wurde in 4h Cr-51 Release Assay die zytotoxische Aktivität bestimmt. Werte stammen aus zwölf unabhängigen Experimente mit unterschiedlichen Donoren.

Abbildung 4.5.3.3 : Zytotoxische Aktivität von humanen PBMZ auf B-721 Zielzellen



Legende:

PBMZs wurden über 24h stimuliert. Anschliessend wurde in 4h Cr-51 Release Assay die zytotoxische Aktivität bestimmt. Werte stammen aus sieben unabhängigen Experimente mit unterschiedlichen Donoren.

Die Abbildungen zeigen Mittelwerte der spezifischen Zytotoxizität von PBMZ auf NK-Zielzellen im Cr-51 Freisetzung-Assay. Die Zytotoxizität wurde für die einzelnen Zelllinien bewusst bei unterschiedlichen Effektor-Zielzell-Verhältnissen untersucht, da die Chromfreisetzung zunächst kontinuierlich mit Zunahme der Effektorzellen ansteigt, dann aber ab einem gewissen Verhältnis, das für jede Zielzelllinie unterschiedlich ist, stagniert. Für die Darstellung wurden daher jeweils Verhältnisse mit maximaler Aktivität gewählt, die für die unterschiedlichen Zelllinien in jeweils anderen Bereichen lagen.

ODN 2006 zeigte dabei bei hohen Effektor-Zielzell-Verhältnissen eine signifikante Steigerung der zytotoxischen Aktivität PBMZ auf den NK sensitiven Zielzellen K-562 und Daudi. Auf der Lymphomzelllinie B-721, die einen normalen MHC I Komplex trägt, ließ sich für 2006 nur ein sehr geringer Effekt zeigen. Im Vergleich dazu ist die Zytotoxische Aktivität der mit polyI:C stimulierten PBMZ auf NK Zell sensitiven Zelllinien und auf der B-Zell-Lymphomlinie B-721 signifikant erhöht.

Im Weiteren wurde untersucht, inwieweit Zytokine an der Steigerung der NK Zell Aktivität beteiligt sind.

4.5.4 Abhängigkeit der gesteigerten Zytotoxizität von ODN induzierten Zytokinen

Wie bereits in Abb. 4.2.1 gezeigt, induzieren CpG ODN auf humanen PBMZ die Produktion von diversen Zytokinen. Im Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit der Einfluß von CpG ODN auf die NK Zell Aktivität durch diese Zytokine vermittelt wird. In der Literatur wurden im Bezug auf NK Zell Aktivität insbesondere IL12, TNF, IFN γ , und Typ I Interferon als Modulatoren diskutiert(12;19). Anhand NK Zytotoxizitätsassays sollte die Bedeutung dieser Zytokine im Zusammenhang mit ODN Stimulation untersucht werden. Die Assays wurden wie unter 3.3.3.1 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde dem Kulturmedium zusätzlich zu den Stimuli 2006 und polyI:C blockierende Antikörper gegen Zytokine zugesetzt, die durch ODN in PBMZ in vitro Kultur induziert werden (siehe 4.2) und in der Literatur als mögliche Einflussfaktoren für die NK Zell Aktivität diskutiert werden.

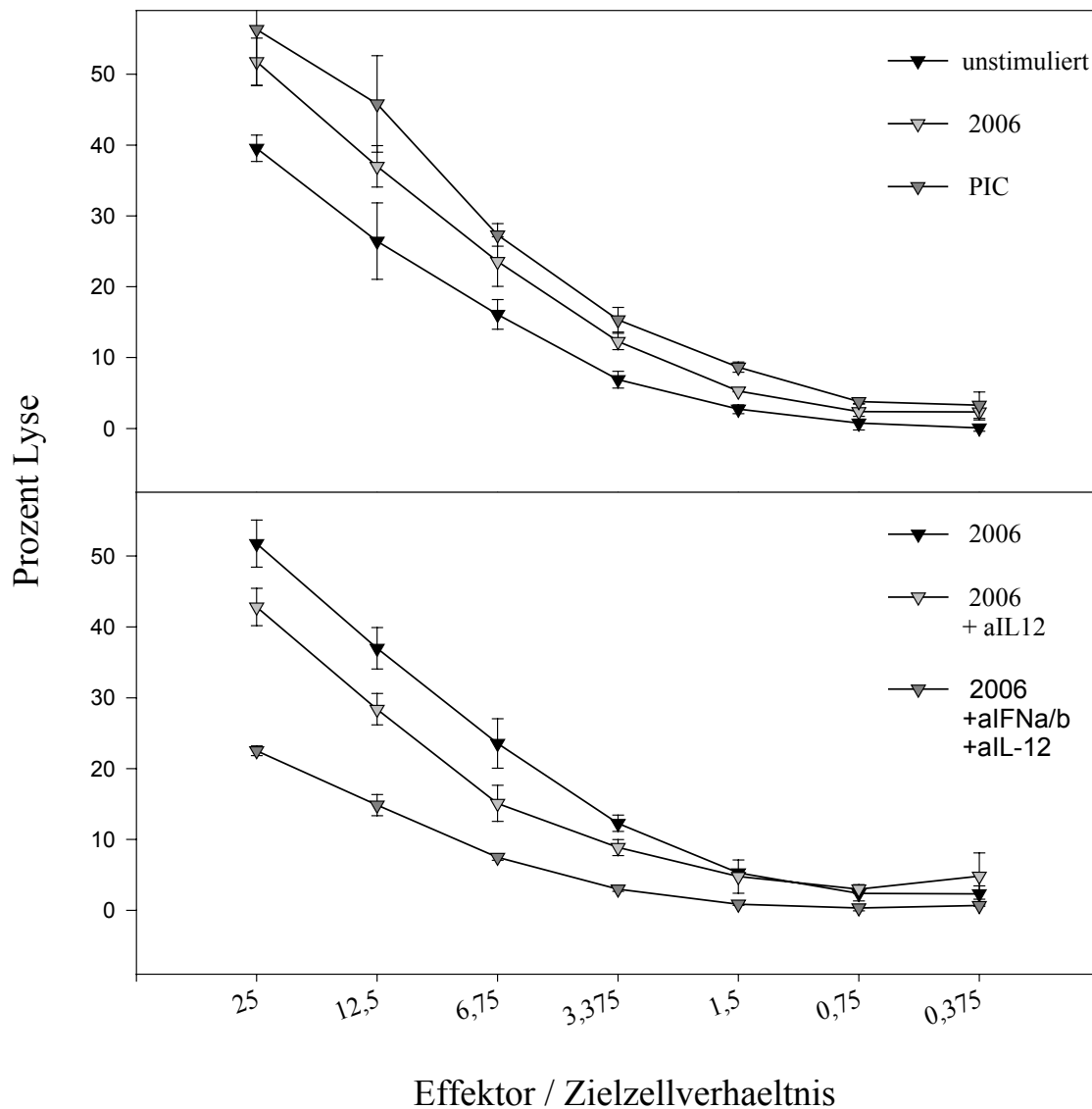
4.5.4.1 Abhängigkeit von TNF- α , IFN- γ und IL-12

Für TNF- α und IFN- γ blockierende Antikörper konnte, wie erwartet, eine Abschwächung der natürlichen Zytotoxizität gezeigt werden (Daten nicht dargestellt). Da wie in Abbildung 4.2.1

gezeigt beide Zytokine durch ODN nur in geringer Menge induziert werden, wurde dieser Effekt nicht weiter verfolgt.

Für Interleukin-12 blockierende Antikörper zeigte sich zunächst ein interessanter Trend (siehe Abb. 4.5.4.1.1). Bei Zugabe Interleukin-12 blockierender Antikörper nahm die Zytotoxizität von NK-Zellen auf K-562 Zielzellen nach ODN Stimulation ab und konnte in Kombination mit anti Interferon Typ I Antikörpern sogar weiter gesenkt werden.

Abbildung 4.5.4.1.1: Verhalten der NK-Zell-Zytotoxizität auf K562 Zielzellen in Abhängigkeit von IL-12 blockierenden Antikörpern

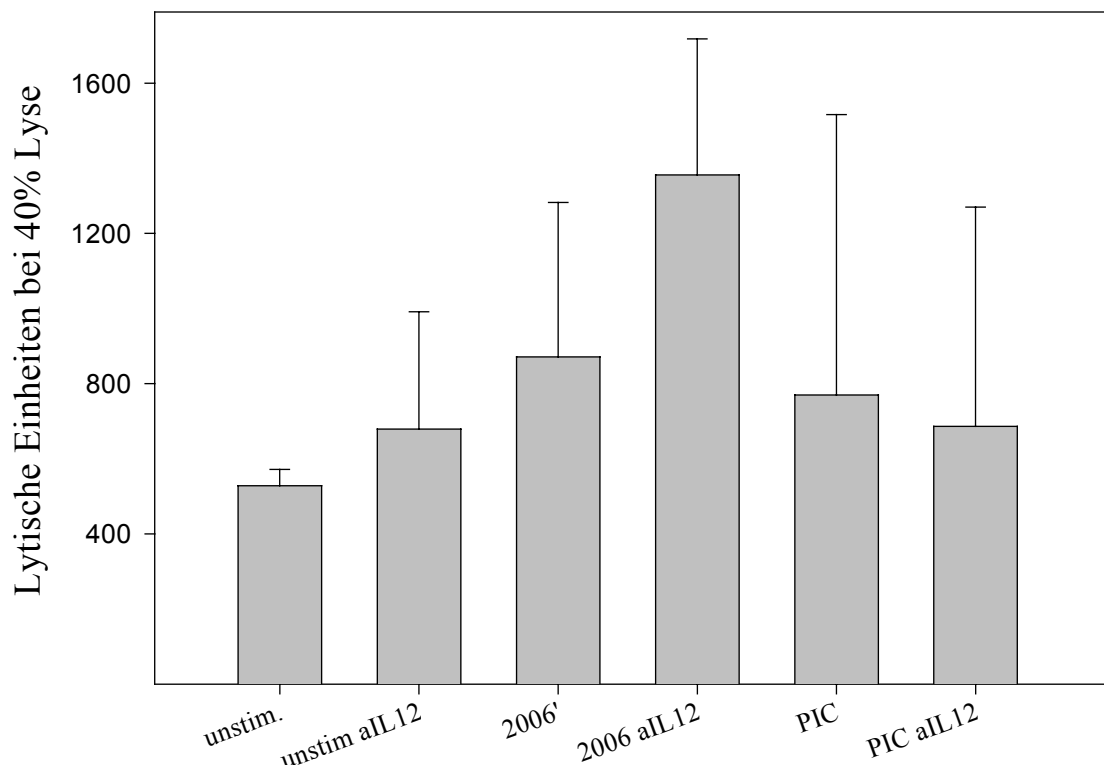


Legende zu Abb. 4.5.4.1.1: PBMZ wurden in 24-Lochplatten zu 5×10^6 /ml Medium für 24h inkubiert. Den Kulturen wurde dabei 2006 $2 \mu\text{M}$ oder polyI:C $50 \mu\text{M}$ und die angegebenen blockierenden Antikörper zugegeben. Der 4h Cr-51 Release Assay wurde entsprechend 3.3.3 durchgeführt. Daudi und B-721 wurden als Kontrollen mitgeführt (Daten nicht dargestellt). Die Graphik zeigt ein Experiment. Mittelwerte und Standardabweichung entsprechen dreifach Bestimmung im Chrom Assay.

Das an einem Einzelspender oben dargestellte Ergebnis, entsprach zwar den Erwartungen aus der Literatur, konnte aber nach mehrmaliger Wiederholung nicht reproduziert werden. Eine Weiterführung der Versuche mit anti-IL-12 blockierenden Antikörpern brachte im Folgenden eher unerwartete Ergebnisse. Die Zytotoxizität nahm nach Beigabe von anti-IL-12 trendmäßig

zu. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.4.5.2 dargestellt. Durch Zusatz von IL-12 p70 ließ sich die zytotoxische Aktivität zwar steigern (Daten nicht gezeigt), nach Zugabe von anti-IL-12 war dann allerdings nicht wie erwartet ein Abfall sondern ebenfalls eine Zunahme der Aktivität sichtbar.

Abbildung 4.5.4.1.2: Verhalten der NK-Zell-Zytotoxizität auf K562 Zielzellen in Abhängigkeit von IL-12 blockierenden Antikörpern



Legende zu Abb. 4.5.4.1.2: PBMZ wurden in 24-Lochplatten zu 5×10^6 /ml Medium für 24h inkubiert. Den Kulturen wurde dabei 2006 2 μ M oder polyI:C 50 μ M und die angegebenen blockierenden Antikörper zugegeben. Der 4h Cr-51 Release Assay wurde entsprechend 3.3.3 durchgeführt. Daudi und B-721 wurden als Kontrollen mitgeführt (Daten nicht dargestellt). Die Graphik zeigt ein Experiment. Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei vergleichbaren unabhängigen Experimenten von fünf.

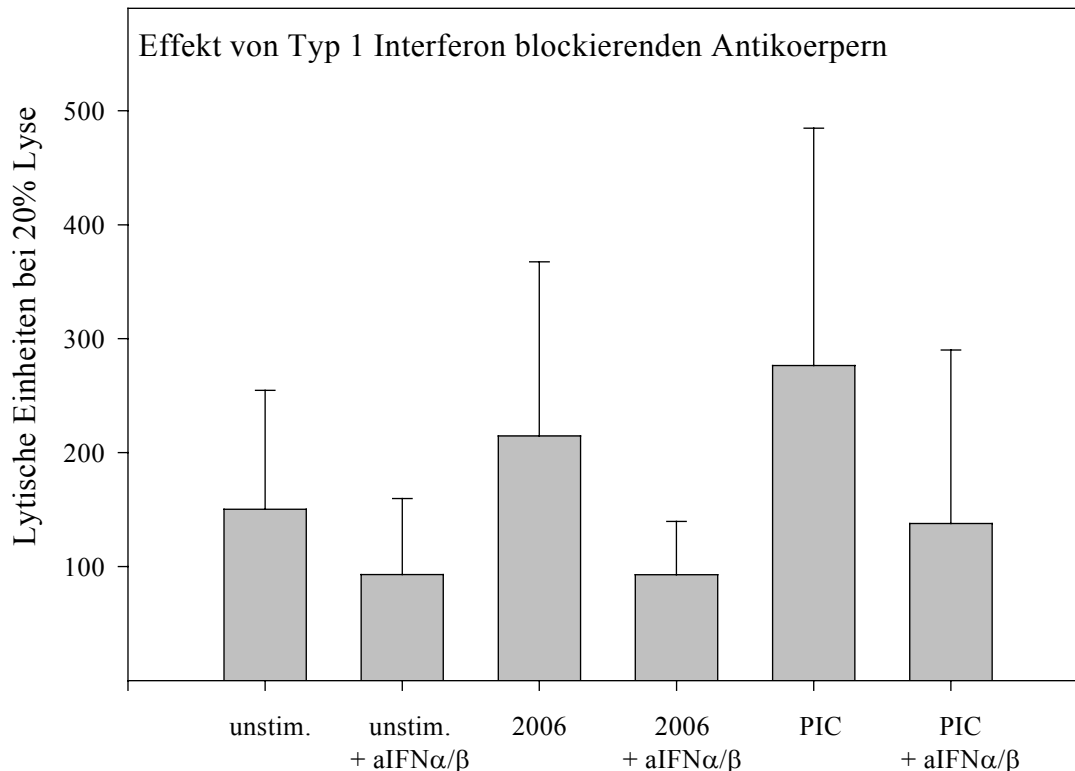
4.5.4.2 Abhängigkeit der CpG ODN induzierten Steigerung der NK Zell Aktivität von Interferon Typ I

Das eigentliche Interesse im Zusammenhang mit der NK-Zell Zytotoxizität galt jedoch der Bedeutung von Typ I Interferon. Typ I Interferon wird nach ODN Stimulation einer PBMZ Kultur von dendritischen Zellen gebildet. Dabei ist besonders eine Art dendritische Zelle für die Interferon Produktion verantwortlich, sie wird im Folgenden als plasmazytoide dendritische Zelle, IL3-Rezeptor alpha positive dendritische Zelle oder CD123 positive dendritische Zelle bezeichnet.

Um Aufschluss über der Wirkung und Bedeutung des induzierten Typ I Interferon zu erhalten, wurden wie gehabt NK-Zell Zytotoxizitäts Assays durchgeführt. Dabei wurden den Kulturen zusätzlich zu den jeweiligen Stimuli Typ I Interferon Antikörper zugesetzt. Typ I Interferon ist aus mehreren Komponenten zusammengesetzt, in den Versuchen wurden Interferon alpha und beta blockierende Antikörper in Konzentrationen entsprechend einer Blockade von 1000 U/ml des jeweiligen Interferons verwendet.

Abbildung 4.5.4.2.1 - 4.5.4.2.3 zeigen die Ergebnisse.

Abbildung 4.5.4.2.1: Effekt von Interferon Typ 1 blockierenden Antikörpern auf die NK-Zell-Zytotoxizität gegen K562 Zielzellen



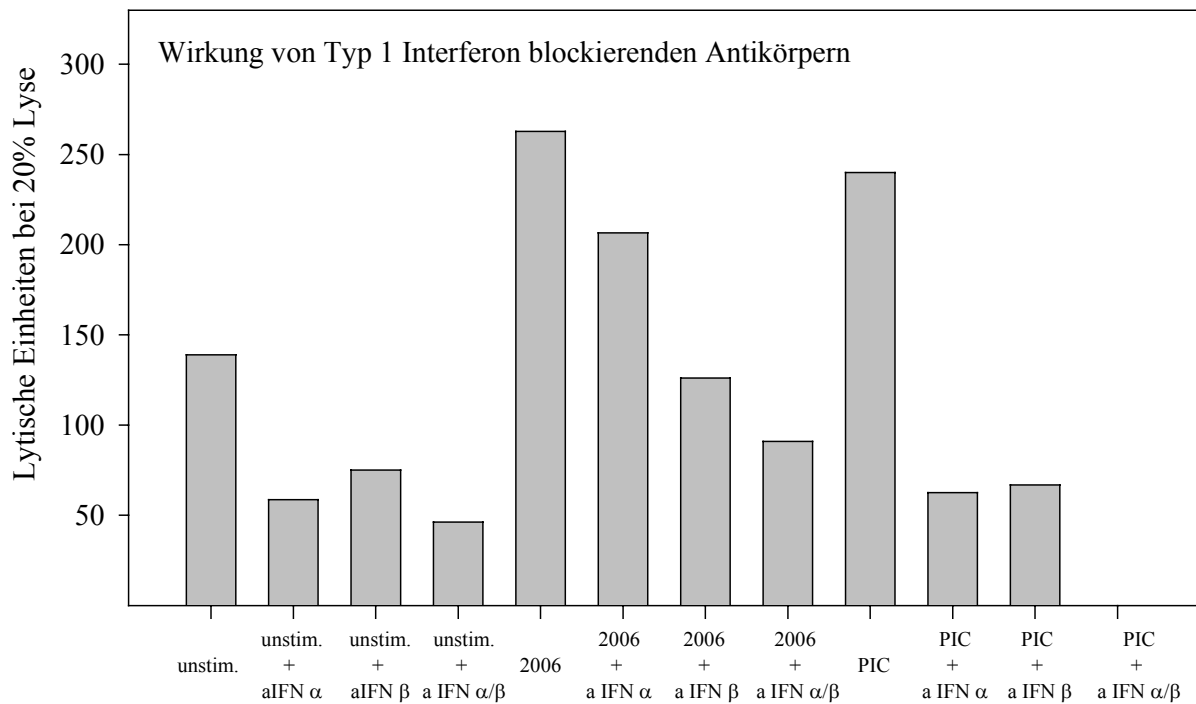
Legende: PBMZ wurden in 24-Lochplatten zu 5×10^6 /ml Medium für 24h inkubiert. Den Kulturen wurde dabei 2006 $2 \mu\text{M}$ oder polyI:C $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ und eine Kombination von alpha und beta Typ 1 Interferon blockierenden Antikörpern zu je $1000 \text{ U}/\text{ml}$ zugegeben. Der 4h Cr-51 Release Assay wurde entsprechend 3.3.3 durchgeführt. Daudi und B-721 wurden als Kontrollen mitgeführt (Daten nicht dargestellt). Die Graphik zeigt Mittelwert und Standardabweichung von 7 unabhängigen Experimenten. Neun weitere Experimente zeigen bei 30%/20% Lyse dasselbe Muster, allerdings aufgrund der Spendervariabilität auf unterschiedlichem Ausgangsniveau.

Die Abbildung repräsentiert insgesamt 15 unabhängige Experimente. Sie zeigt, dass Typ 1 Interferon blockierende Antikörper einen hemmenden Einfluss auf die NK-Zell-Zytotoxizität haben. Eine durch 2006 oder polyI:C hervorgerufene Steigerung der Zytotoxizität kann dabei unterdrückt werden. Statistische Signifikanz wird in diesen Versuchen leider nicht erreicht. Dies ist auf die enorm große Variabilität der Spenderzellen zurückzuführen, die sich in unterschiedlicher ODN Responsivität, verschiedener Bereitschaft zur Zytokinproduktion und in einem ungleichen Ausgangsniveaus der natürlichen Zytotoxizität manifestiert. Aus diesem

Grund konnten von den 15 durchgeführten Experimenten auch nie mehr als sieben statistisch miteinander verglichen werden. Der gezeigte Trend ist jedoch für alle Experimente gültig.

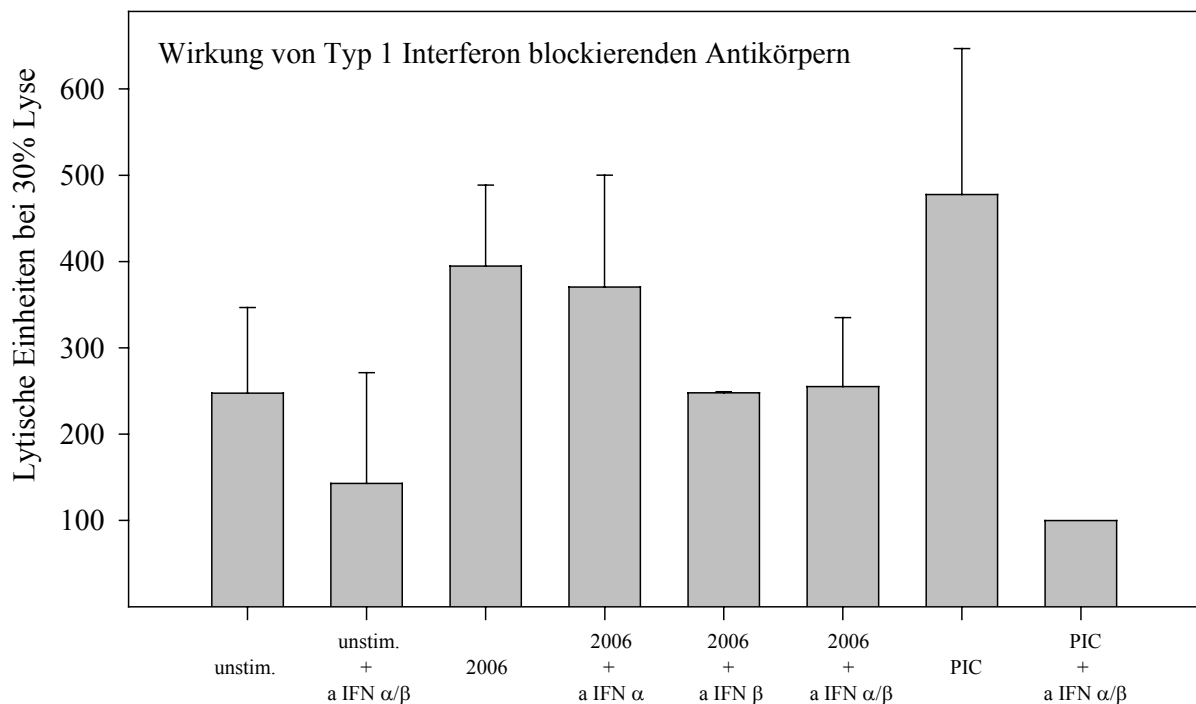
Für Typ I Interferon blockierende Antikörper konnte also eine deutliche Abnahme der Zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen gezeigt werden. Da Typ I Interferon aber aus Interferon alpha und Interferon beta zusammengesetzt ist, stellte sich zusätzlich die Frage, inwieweit beide Komponenten für diesen Effekt einzeln oder gemeinsam verantwortlich sind. Zur Klärung dieser Frage wurden weitere fünf Zytotoxizitätsassays durchgeführt. Die blockierenden Antikörper von alpha- und beta-Interferon wurden diesmal jedoch sowohl einzeln als auch in Kombination eingesetzt. Abbildung 4.5.4.2.2 und 4.5.4.2.3 stellen die Ergebnisse graphisch dar, dabei ist in 4.5.4.2.2 ein repräsentativer Spender von fünf herausgegriffen, 4.5.4.2.3 zeigt eine statistische Zusammenfassung mehrerer ähnlicher Spender. Eine Gesamtdarstellung aller Spender ist nicht möglich, da ihre Reaktionsbereitschaft auf ODN und ihre Grundaktivität auf zu unterschiedlichen Niveaus lagen. Das dargestellte Muster blieb aber auch auf den unterschiedlichen Niveaus gleich.

Abbildung 4.5.4.2.2: Wirkung von Typ I Interferon blockierenden Antikörpern auf die ODN induzierte NK-Zell Aktivität:



Legende: PBMZ wurden in 24-Lochplatten zu 5×10^6 /ml Medium für 24h inkubiert. Den Kulturen wurde dabei 2006 $2 \mu\text{M}$ oder polyI:C $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ und eine Kombination von alpha und beta Typ 1 Interferon blockierenden Antikörpern zu je $1000 \text{ U}/\text{ml}$ zugegeben. Der 4h Cr-51 Release Assay wurde entsprechend 3.3.3 durchgeführt. Daudi und B-721 wurden als Kontrollen mitgeführt (Daten nicht dargestellt). Die Graphik zeigt das Reaktionsmuster eines repräsentativen Spenders. Berechnung der Lytischen Einheiten vgl. 3.3.3.1.

Abbildung 4.5.4.2.3: Getrennte Analyse für Interferon alpha und beta blockierende Antikörper



Legende: PBMZ wurden in 24-Lochplatten zu 5×10^6 /ml Medium für 24h inkubiert. Den Kulturen wurde dabei 2006 $2 \mu\text{M}$ oder polyI:C $50 \mu\text{g/ml}$ und die angegebenen blockierenden Antikörper zugegeben. Der 4h Cr-51 Release Assay wurde entsprechend 3.3.3 durchgeführt. Daudi und B-721 wurden als Kontrollen mitgeführt (Daten nicht dargestellt). Die Graphik zeigt Mittelwerte und Standardabweichung für drei unabhängige Experimente.

Wie in den Abbildungen 4.5.4.2.2 gezeigt, blockieren sowohl alpha- als auch beta-Interferon Antikörper einen Teil der Aktivität von NK-Zellen. Dabei scheint Interferon-beta alleine die größere Rolle zu spielen. Eine Kombination beider Antikörper ergibt einen additiven Effekt, der die ODN induzierte Aktivität aber nicht komplett ausschalten kann.

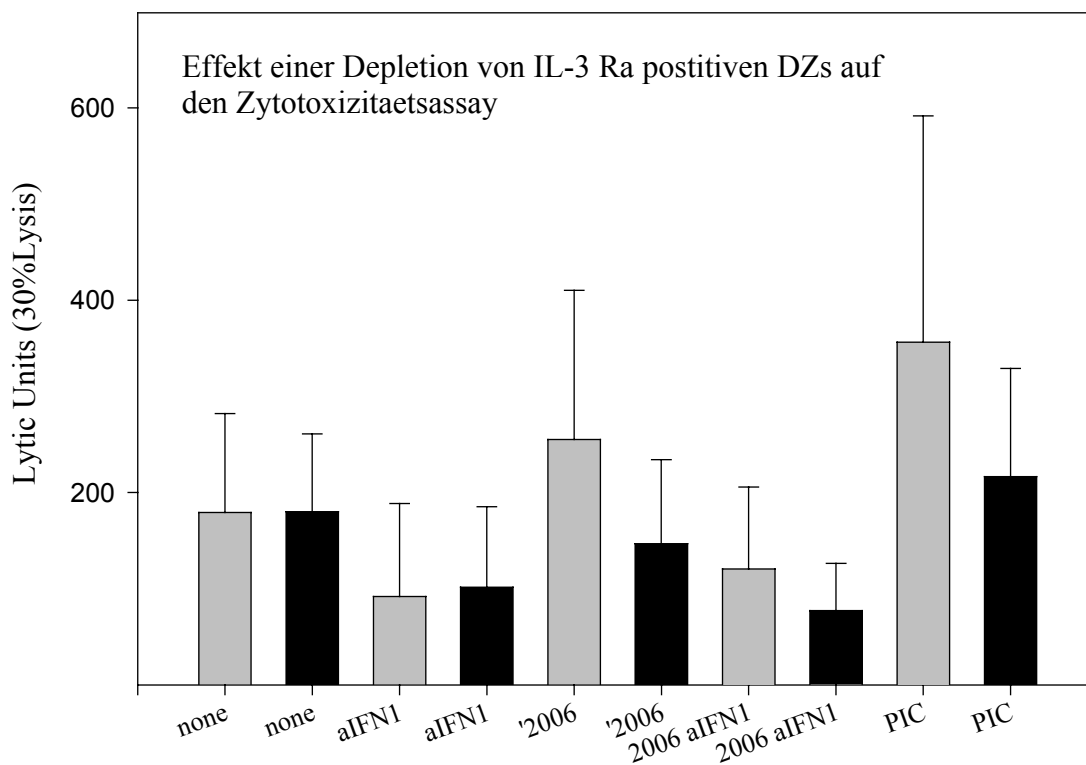
Dieser Trend bleibt auch bei statistischer Zusammenfassung mehrerer Spender erhalten, wie aus Abb. 4.5.4.2.3 ersichtlich, wobei der stufenweise Abfall nach Zugabe der einzelnen Antikörper nicht mehr so klar zu erkennen ist.

Typ I Interferon schien also für die Aktivierung von NK Zellen durch ODN von entscheidender Bedeutung zu sein. Wie schon weiter oben erwähnt, wird Typ I Interferon nach Stimulation mit 2006 ODN vor allem von einer dendritischen Zelle produziert, der CD123 positive (IL-3 R alpha positive) plasmazytoiden dendritische Zelle.

Aus dieser Tatsache ergab sich die Annahme, dass eine Depletion CD123 positiver dendritischer Zellen einen deutlichen Einfluss auf die NK-Zell-Zytotoxizität haben sollte. Im Folgenden sind die Ergebnisse von Chrom-Assays vor und nach Depletion der plasmazytoiden dendritischen Zellen gezeigt.

Die PBMZ wurden vor und nach Depletion im FACS überprüft und eine vollständige Eliminierung der CD123 positiven nachgewiesen (Daten nicht abgebildet).

Abbildung 4.5.4.2.4: Auswirkung einer Depletion von CD123 positiven Zellen auf die Zytotoxische Reaktion nach ODN Stimulation



Legende: PBMZ (graue Balken) bzw. PBMZ nach Depletion der IL-3 R α positiven (schwarze Balken) wurden in 24-Lochplatten zu 5×10^6 /ml Medium für 24h inkubiert. Den Kulturen wurde dabei 2006 $2 \mu\text{M}$ oder polyI:C $50 \mu\text{g/ml}$ und die angegebenen blockierenden Antikörper zugegeben. Der 4h Cr-51 Release Assay wurde entsprechend 3.3.3 durchgeführt. Daudi und B-721 wurden als Kontrollen mitgeführt (Daten nicht dargestellt). Die Graphik zeigt Mittelwert und Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen.

Beim Betrachten der Ergebnisse kann man Folgendes feststellen: Eine Depletion der Zellen allein, hat noch keine Auswirkung auf die Zytotoxizität. Und sowohl mit als auch ohne CD123 positive sind PBMZ für Typ I Interferon Antikörper sensibel und zeigen einen Abfall der Aktivität. Möglicherweise ist dieser Effekt auf eine unspezifische Aktivierung der

Monozyten / Makrophagen Fraktion bei der Zellpräparation zurückzuführen, die auch IFN α und β produzieren können. Bei Stimulation mit ODN und polyI:C ist eine deutliche Abnahme der Reaktionsbereitschaft der Zellen nach Depletion der CD123 positiven zu verzeichnen. Es ist jedoch auch nach ODN Stimulation der CD123 depletierten PBMZ noch möglich, einen Teil der zytotoxischen Aktivität durch Typ I Interferon blockierende Antikörper herabzumindern.

Es muss also wohl noch einen weiteren Faktor geben, der Einfluss auf die Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen besitzt, wenn man annimmt, dass die nicht blockierbare Restaktivität nicht allein durch eine konstitutive Lysebereitschaft der NK-Zellen zustande kommt.

4.5.4.3 Abhängigkeit der NK-Zell-Zytotoxizität von IL-15

Bei der Aktivierung des Immunsystems durch Viren werden häufig Typ I Interferon und IL-15 als regulierende Zytokine besprochen(24;49). Da ODN Typ I Interferon induzieren und auch strukturell Zellen auf ähnliche Weise aktivieren wie Virus RNA, stellte sich die Frage, inwiefern IL-15 bei der Aktivierung durch ODN eine Rolle spielt.

Um dies zu klären, mussten mehrere grundsätzliche Punkte geklärt werden:

Zum einen musste gezeigt werden, dass PBMZ nach ODN Stimulation IL-15 exprimieren, zum anderen war dann abzuwarten, ob und was für einen Effekt IL-15 auf die NK-Zell-Aktivität hatte.

Zunächst also zur Klärung des ersten Punktes. Wird IL-15 durch ODN Stimulation in PBMZ induziert?

Der zu der damaligen Zeit erhältliche IL-15 ELISA war nicht besonders sensitiv und somit wurde versucht zunächst auf mRNA Ebene zu klären, ob eine Induktion von IL-15 nach ODN Stimulation stattfand.

4.5.4.3.1 Induktion von IL-15 mRNA durch CpG ODN auf humaner PBMZ Kultur

Für den Nachweis von IL-15 wurde eine semiquantitative IL15-PCR entwickelt. Als House-Keeping Gen wurde GAP-DH in Taq-Man PCR verwendet. Die genauen PCR-Bedingungen sind unter 3.4.3.3 für IL-15 und 3.4.3.4 für GAP-DH beschrieben.

Zur Versuchsoptimierung wurden nach Stimulation von PBMZ alle 2 h über 24h hinweg Proben gewonnen. Anhand der daraus ersichtlichen Kinetik (Daten nicht dargestellt) wurden der optimale Zeitpunkt zur RNA Gewinnung 12h nach Stimulation gewählt.

Nach Festlegung all dieser Parameter konnten Stimulationsversuche durchgeführt werden. Dabei wurden PBMZ wie unter 3.1.1 beschrieben in Kultur genommen und mit 2006, AP1 (je 2 µM) oder polyI:C (25 µg/ml) stimuliert. Anschließend wurde die RNA isoliert (vgl. 3.4.3.1) und revers transkribiert (vgl. 3.4.3.2). Die so gewonnene cDNS wurde in einer Taq-Man PCR für GAP-DH quantifiziert, um in der folgenden IL-15 PCR gleiche Mengen cDNS einsetzen zu können.

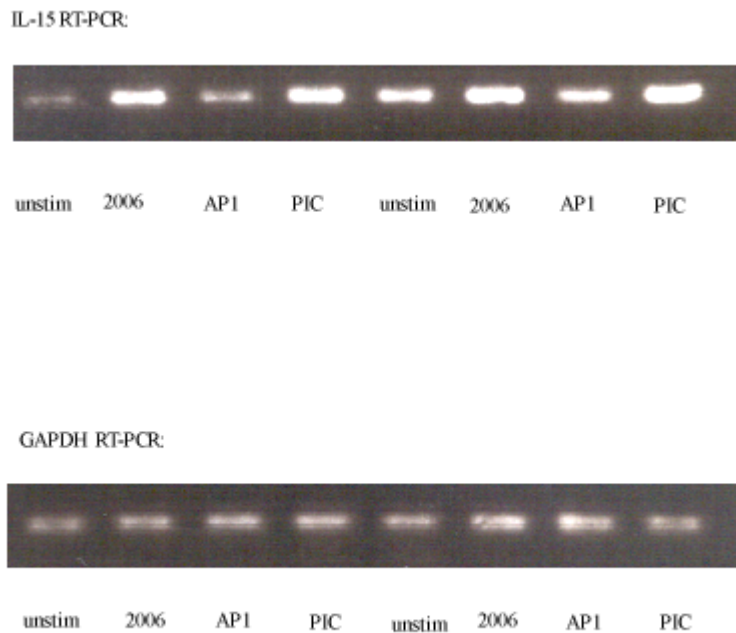
In Tabelle 4.5.4.3.1 sind die Ergebnisse der Taq-Man PCR und die abgeleiteten Verdünnungsstufen für die cDNS einmal exemplarisch dargestellt. Die hohe Übereinstimmung der Zyklen, spricht für eine große Genauigkeit und angemessene Versuchsbedingungen bei der Aufbereitung.

Tabelle 4.5.4.3.1: Taq-Man Zyklen für GAP-DH

Spender	Versuchsbedingungen	Taq-Man Zyklen (Mittelwert aus Doppeltbestimmung)	(Standardabweichung aus Doppeltbestimmung)	Verdünnung
A	unstimuliert	17.28	0.042	1 : 1
A	2006 2 mM	17.635	0.078	1 : 0.5
A	AP1 2 mM	18.075	0.332	1
A	polyI:C 25 mg/ml	17.79	0.169	1
B	unstimuliert	18.38	0.240	1
B	2006 2 mM	17.68	0.127	1 : 0.5
B	AP1 2 mM	17.235	0.1343	1 : 1
B	polyI:C 25 mg/ml	18.23	0.283	1

Nach der Überprüfung der cDNS Proben im Taq-Man wurde die eigentliche IL-15 PCR wie unter 3.4.3.4 beschrieben durchgeführt. Abbildung 4.5.4.3.1 zeigt ein repräsentatives Gel.

Abbildung 4.5.4.3.1: Darstellung der PCR Produkte für IL-15 und GAP-DH



Legende: PBMZ wurden zu 5×10^6 in 24-well Flachbodenplatten kultiviert und mit 2006 $2 \mu\text{M}$, AP1 $2 \mu\text{M}$ oder polyI:C 50 für 12h stimuliert. Anschließend wurde RNA gewonnen, revers transkribiert. Die gewonnene c-DNA wurde zur semiquantitativen IL-15 PCR wie unter 3.4.3 eingesetzt. Die PCR Produkte wurden auf 1.5% Agarose Gel aufgetragen, in Ethidiumbromid inkubiert und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Der Gelabschnitt zeigt IL-15 und GAPDH Banden von zwei unabhängigen Spendern.

Aus den Versuchen kann man folgendes schließen. Bei Stimulation von PBMZ Kultur über 12h mit 2006 und polyI:C, lässt sich eine vermehrte Expression von IL15 mRNA gegenüber den unstimulierten Testbedingungen oder AP1 nachweisen. Die Induktion ist allerdings relativ gering und bei Verdünnung der c-DNA Proben vor PCR auch für kleine Verdünnungsfaktoren relativ schwierig nachweisbar (Ergebnisse nicht dargestellt).

Eine Möglichkeit, einen besseren Blick auf die Induktion zu gewinnen war es, die IL-15 produzierende Zellpopulation ausfindig zu machen und dann eventuell durch Isolation dieser Zellen vor Gewinnung der RNA den Effekt besser sichtbar zu machen. Diese Strategie erwies sich allerdings aufgrund der Modifikation der Zelllinien Marker auf der Zelloberfläche von PBMZ nach ODN Stimulation als nicht zufrieden stellend.

Es blieb also zu zeigen, ob der geringe Effekt auf mRNA Ebene, ein Korrelat auf Proteinebene hatte und inwieweit IL-15 nach ODN Stimulation in einem biologischen Kontext Bedeutung zeigte.

Auf Protein Ebene stellten sich ebenfalls Schwierigkeiten ein. Wie schon oben erwähnt, war der erhältliche IL-15 ELISA zu der Zeit sehr wenig sensitiv. Als Alternative standen CTLL-Bioassay und FACS Färbungen an der Zelloberfläche und Intrazellulär zur Verfügung. Zunächst zur FACS Färbung.

4.5.2.3.2 IL-15 auf der Zelloberfläche:

Es ist in anderem Zusammenhang beschrieben, dass sich die Expression von IL-15 auf der Zelloberfläche von PBMZ Subpopulationen durch Stimulation verändert (48). Es war also möglich, dass Stimulation von PBMZ mit ODN eine Veränderung der IL-15 Expression auf der Zelloberfläche zur Folge hatte. Schon in preliminären Versuchen stellte sich allerdings heraus, dass die Oberflächenexpression von IL-15 auf der Zelloberfläche nach Stimulation zu unspezifisch erfolgte, um eine nähere Untersuchung des Phänomens interessant erscheinen zu lassen.

Nun blieb also der Versuch im CTLL Assay IL-15 Aktivität zu messen.

4.5.4.3.3 CTLL Bioassay

Aufgrund der Zusammensetzung des trimeren IL-15 Rezeptors(25) aus der eigenen IL-15 α Einheit(22) und der β -(4) und γ -(50) Untereinheit des IL-2 Rezeptors, kann die IL-2 abhängige Zell Linie CTLL-2 für einen Bio-Assay zur Bestimmung von IL-15 herangezogen werden.

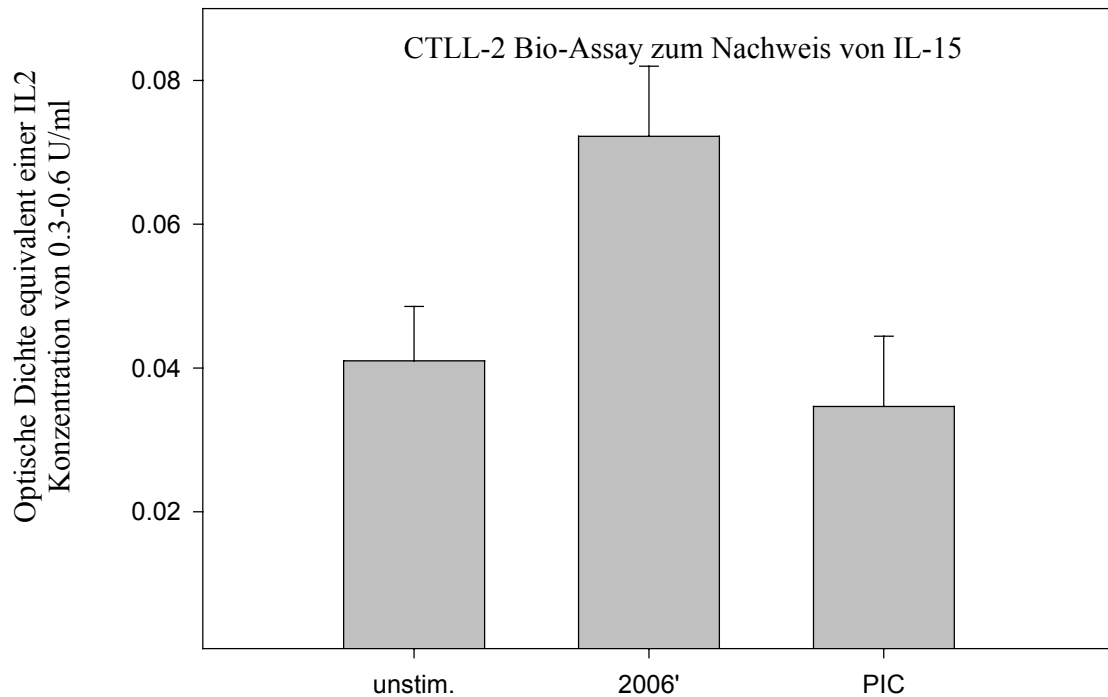
Zunächst wurde die Abhängigkeit der Zellen von IL-2 überprüft: Bei Zugabe von IL-2 kann eine Standardkurve titriert werden, die in einem Bereich entsprechend 0.15 – 40 U/ml IL-2 genau ist. Der Effekt von zugegebenem IL-2 ist mit anti-IL-2 Antikörpern blockierbar.

Zur weiteren Absicherung wurden Überstände einer 24 h PBMZ Stimulation im IL-2 ELISA untersucht. In den entsprechend 3.4.1 gewonnen Überständen kann man für keine der Versuchsbedingungen IL-2 im Überstand nachweisen. Dasselbe gilt für IL-4 das ebenfalls zu falschpositiven Ergebnissen im CTLL-2 Assay führen könnte. Zusätzlich wurden bei den Versuchen anti-IL2 und anti-IL4 Antikörper zugegeben, um die Aktivität sicher IL-15 zuweisen zu können.

Rekombinantes IL-15 stand leider nicht zur Verfügung, weshalb im Folgenden ein IL-2 Standard zur vergleichenden Aktivitätsbestimmung aufgetragen wurde. Im CTLL-Assay kann man dabei einen minimalen Hinweis auf IL-15 Produktion von PBMZ nach ODN Stimulation erhalten. In dem dargestellten Experiment, liegt die Aktivität für ODN Stimulation dabei über die polyI:C induzierten Aktivität. Andere Donorzellen ergaben ebenfalls einen geringen

Zuwachs an Aktivität, dass Verhältnis von ODN und polyI:C war für einige Spender umgekehrt. Da sich, wie aus Abbildung 4.5.4.3.3 ersichtlich, nur geringe Aktivitätsänderungen nachweisen ließen, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

Abbildung 4.5.4.3.3:



Legende: PBMZ wurden in 24-well Platten für 24h mit 2006' 2µM und polyI:C 25 µM stimuliert.

Die Überstände wurden nach Zugabe von anti-IL-2 und anti-IL-4 blockierenden Antikörpern im CTLL-2 Assay auf Aktivität untersucht. Mittelwert und Standardabweichung entspricht 12-fach Bestimmung im CTLL-2 Assay.

Nach den oben dargestellten Versuchen IL-15 in RT-PCR, in FACS Färbung und CTLL Assay, kann man die Ergebnisse folgendermaßen zusammenfassen. In RT-PCR lässt sich ein kleiner Zuwachs der IL-15 mRNA Expression für Stimulation mit ODN und polyI:C nachweisen, der eindeutig reproduzierbar, jedoch nur schwer quantifizierbar ist. Im CTLL-2 Assay sieht man eine fragliche Stimulation der Zellen mit Überständen von ODN behandelten PBMZ.

Gerade wegen der Geringfügigkeit der Änderungen, war es wichtig in einem funktionellen Assay zu überprüfen, ob die Ab- und Zunahme von IL-15 eine funktionelle Bedeutung hat.

4.5.4.3.4 Funktioneller Nachweis von IL-15 – Einfluss von IL-15 blockierenden Antikörpern auf die NK-Zytotoxizität:

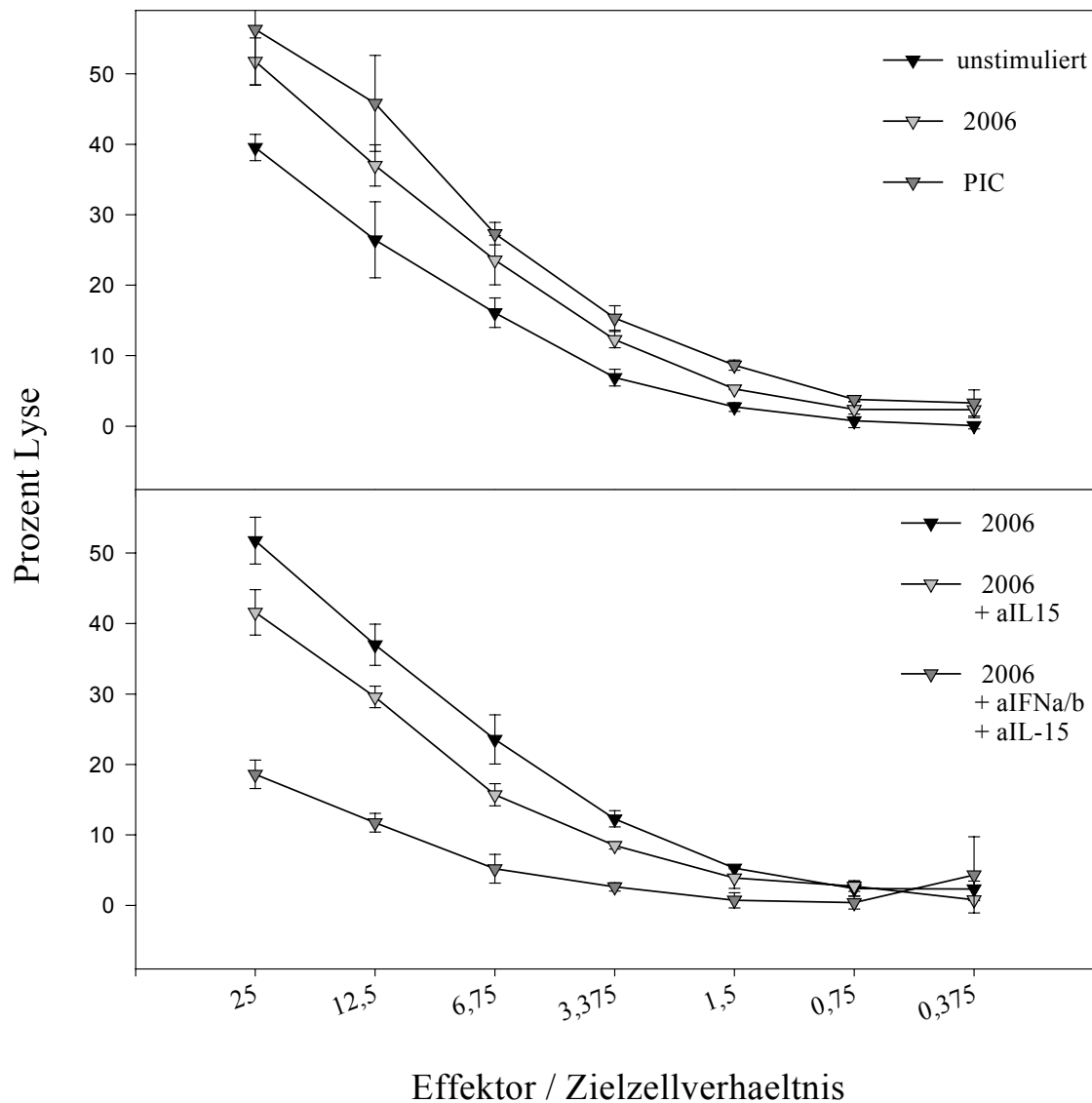
Zur Prüfung der funktionellen Bedeutung von IL-15 eignete sich der NK-Zell Zytotoxizitätsassay. Unter 4.5.4.2 war eine Abhängigkeit der ODN induzierten Steigerung der Aktivität von Typ I Interferon schon besprochen worden. Da die Zytotoxizität durch Interferon-alpha und -beta blockierende Antikörper nicht vollständig aufgehoben wurde, hatte sich damals die Frage nach weiteren Einflussfaktoren gestellt. Und im Anschluss daran waren die oben geschilderten Versuche zum Nachweis einer IL-15 Induktion von ODN durchgeführt worden.

Die Abbildungen 4.5.4.3.4.1 und 4.5.4.3.4.2 zeigen nun Versuche zur NK-Zell Zytotoxizität im Zusammenhang mit anti IL-15 blockierenden Antikörpern.

PBMZ wurden in Kultur genommen und mit den jeweiligen Stimuli und Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde ein Chrom Assay durchgeführt. Bei einem preliminären Experiment an einem gesunden Spender, stellten sich die Ergebnisse entsprechend Abbildung 4.5.4.3.1 dar.

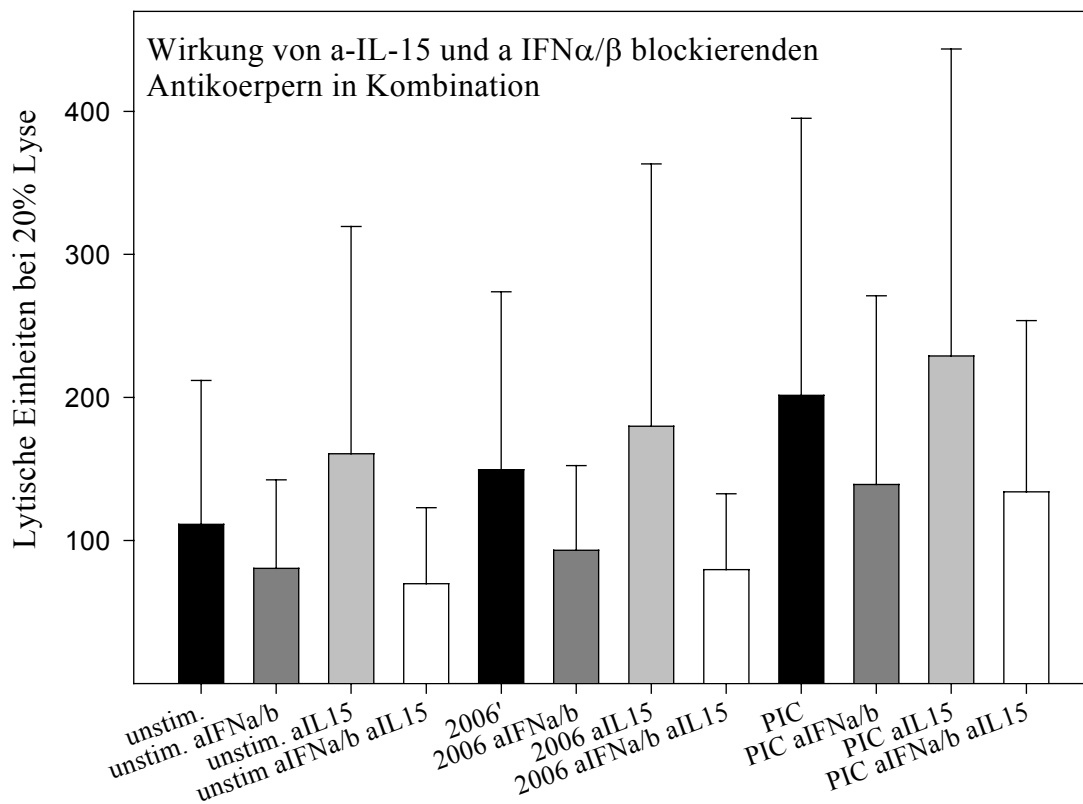
IL-15 blockierende Antikörper hemmten die NK-Zytotoxizität und wirkten dabei additiv mit Typ I Interferon blockierenden Antikörpern zusammen. Weitere Versuche wurden durchgeführt, um diesen Trend zu verfolgen.

Abbildung 4.5.4.3.1: Zytotoxische Aktivität von humanen PBMZ nach 20h Stimulation auf K-562 Zielzellen – Abhängigkeit von Typ I Interferon und IL-15



Legende: PBMZ wurden in 24-Lochplatten zu 5×10^6 /ml Medium für 24h inkubiert. Den Kulturen wurde dabei 2006 $2 \mu\text{M}$ oder polyI:C $50 \mu\text{M}$ und die angegebenen blockierenden Antikörper zugegeben. Der 4h Cr-51 Release Assay wurde entsprechend 3.3.3 durchgeführt. Daudi und B-721 wurden als Kontrollen mitgeführt (Daten nicht dargestellt). Die Graphik zeigt das Ergebnis für einen Spender. Mittelwert und Standardabweichung bezeichnen dreifach Bestimmung im Chrom-Assay.

Leider konnte sich bei mehrfacher Wiederholung des Experiments der zunächst gezeigte Trend nicht bestätigen lassen. In insgesamt sechs unabhängigen Versuchen, war es nicht möglich, ein eindeutiges Muster für die Wirkung von IL-15 blockierenden Antikörpern nachzuweisen. Bestenfalls könnte man eine Steigerung der Zytotoxizität erahnen, was aber zusätzlich durch die extremen Schwankungen in der Responsivität der Spender erschwert wird (vgl. Standardabweichungen).



Legende: PBMZ wurden in 24-Lochplatten zu 5×10^6 /ml Medium für 24h inkubiert. Den Kulturen wurde dabei 2006 $2 \mu\text{M}$ oder polyI:C $50 \mu\text{g/ml}$ und die angegebenen blockierenden Antikörper zugegeben. Der 4h Cr-51 Release Assay wurde entsprechend 3.3.3 durchgeführt. Daudi und B-721 wurden als Kontrollen mitgeführt (Daten nicht dargestellt). Die Graphik zeigt Mittelwert und Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend lässt sich über IL-15 im Zusammenhang mit ODN Stimulation Folgendes sagen. Es gibt einen reproduzierbaren Trend zur Induktion von IL-15 mRNA mit 2006 Stimulation. Auf Proteinebene kann allenfalls im CTLL Assay ein schwacher Trend zur Induktion gezeigt werden, für den in funktionellen Assays kein Bedeutungskorrelat ermittelt werden konnte.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es einige Aspekte der Aktivierung von humanen PBMZ durch CpG ODN näher zu untersuchen. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Differenzierung von T-Helferzell-Antworten und Mechanismen der NK Zell Aktivierung.

In verschiedenen Arbeiten wurde sowohl für das murine als auch für das humane System gezeigt, dass ODN Stimulation einen Zuwachs von kostimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche zur Folge hat(6). Zusammen mit der zuvor diskutierten Induktion von Zytokinen wird damit die Reaktionsbereitschaft eines Organismus beeinflusst und die Zell-Zell-Interaktion verbessert.

T-Zellen werden in invitro Kultur nicht direkt durch ODN aktiviert (9;32), da der CpG Rezeptor TLR 9 im humanen Immunsystem nur auf B Zellen und Plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert wird. Für ein Zusammenspiel der Immunzellen scheint die Interaktion von T-Zellen mit anderen Effektoren allerdings trotzdem als „Bystander“ von Bedeutung zu sein. Um diesen Aspekt besser zu verstehen, wurde versucht, ob sich die T-Zell Hilfe durch CD40Ligation ersetzen lässt. CD 40 Ligand soll für bei der Induktion einer Th-1 gerichteten Immunitätslage von großer Bedeutung sein (70). Das entsprechende Experiment der PBMZ Stimulation unter Kokultivierung von CD40L transfizierten Fibroblasten ist unter Punkt 4.3 im Ergebnisteil beschrieben. Bei der Analyse der Ergebnisse zeigen sowohl Stimulation mit ODN als auch Kokultivierung mit CD40 Ligand einen Effekt auf die Zytokinproduktion. Um eine Aussage über die Bedeutung von CD40Ligand auf der Oberfläche von T-Zellen treffen zu können, hätte eine nach Depletion abgesunkene Zytokinproduktion durch CD40 Ligation wieder herstellbar sein müssen. Vielmehr zeigt sich jedoch zum einen keine signifikante Abnahme der Zytokinproduktion nach T-Zell Depletion und zum weiteren hat CD40 Ligation auch in der vollständigen PBMZ Kultur einen sichtbaren Effekt, der bei Richtigkeit der Annahme redundant sein oder zumindest geringer ausfallen sollte. Der Versuch ermöglicht also keine Aussage über die Bedeutung von CD40L auf T-Zellen. Dies ist wohl am besten durch die Tatsache zu erklären, dass die T-Zellen in diesem Versuch nicht stimuliert waren. CD40Ligand wird nachweislich auf aktivierten stärker als auf ruhenden T-Zellen exprimiert(28;52). Außerdem scheint CD40L bei der Entwicklung einer erfolgreichen TH-1 Antwort, zum Beispiel bei einer Infektion mit M. Leprae, unerlässlich zu sein, es ist also sehr wahrscheinlich, dass CD40Ligand im Rahmen der ODN Stimulation im Beisein von Antigen auch für die Entstehung eines Th-1 Zytokinmilieu von Bedeutung ist.

5.1 Wirkung von ODN auf die T-Zell-Differenzierung

Als Modell für die Analyse des Einfluss von ODN auf die T-Zell Differenzierung wurde die gemischte Lymphozytenkultur gewählt. Der Fremd MHC Komplex auf den APZ des Spenders A wurde als T-Zell Rezeptor Stimulus für Spender B betrachtet und der Effekt von ODN auf die Differenzierung sollte analysiert werden. Als Beurteilungskriterium wurde die Zytokinproduktion von T-Zellen gewählt und diese wurde sowohl in ELISA als auch intrazellulärer FACS Färbung untersucht. Die Gangbarkeit dieses Modells für Differenzierungsversuche wurde überprüft, indem der gemischten Lymphozytenkultur sowohl eine TH-1 richtende Zytokinmischung, bestehend aus IL-12 und anti-IL-4, wie auch TH-2 richtende, bestehend aus IL-4 und anti-IL-12, beigegeben wurde. Dabei konnte im ELISA für das TH-1 Modell eine Zunahme von IFN- γ und eine Abnahme von IL-4 festgestellt werden; für das TH-2 Modell war ein inverser Effekt nachweisbar (vgl. Abb. 4.4.2). In dem Modell einer gemischten Lymphozytenkultur ausgehend von PBMZ zweier Spender lassen sich also Versuche zur TH-1/TH-2 Differenzierung durchführen. Ersetzt man in der Lymphozytenkultur die richtungweisende Zytokinmischung durch ODN 2006, sollte man nach Analyse des Verhältnis von produziertem IFN- γ und IL-4 eine Aussage über die Wirkung von ODN auf die T-Zell Differenzierung treffen können. Bei der Analyse des ODN Effekts auf die gemischte Lymphozytenkultur zeigte sich allerdings nicht eine einseitige Zunahme von IFN- γ oder IL-4, sondern, wie schon unter 4.4 erläutert, eine dosisabhängige Steigerung der Bildung beider Zytokine. Es kann also eine Stimulation nicht jedoch eine Differenzierung induziert werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den später veröffentlichten Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe(26)– Allerdings wird dort der Nachweis einer Th-1 Differenzierung allein an der Steigerung der IFN- γ Produktion festgemacht. Interleukin-4 wird nicht gemessen, was die Vermutung nahe legt, dass mit sensitiveren Methoden eventuell ebenfalls eine Induktion der IL-4 Produktion feststellbar gewesen wäre.

Auch in anderen Versuchen, einen Effekt von ODN auf die Th-1 Differenzierung in vitro zu zeigen, sind die Ergebnisse bestenfalls grenzwertig. Ein Experiment mit naiven T-Zellen als Respondern und plasmazytoiden dendritischen Zellen kann eine ebenfalls nur marginale Wendung in Richtung Th-1 Differenzierung zeigen (7). Wie auch schon gezeigt wurde, dass der Effekt von ODN 2006 auf gereinigte T-Zellen äußerst gering ausfällt(32).

Wenn man diese Ergebnisse den Erkenntnissen aus Tiermodellen(41) entgegenstellt, bietet sich insbesondere im Zusammenhang mit neueren Daten eine plausible Erklärung. Für die Th-1 Differenzierung sind immer wieder Typ 1 Interferone verantwortlich gemacht worden. Die durch ODN 2006 auf humanen in vitro kultivierten PBMZ induzierten Typ 1 Interferon Mengen sind, wie in Abb. 4.2.2 gezeigt, relativ gering, insbesondere auch im Vergleich mit anderen ODN {Sparwasser & Lipford 2000 17 /id}. ODN mit einer stärkeren Typ I Interferon Induktion hätten sich also unter Umständen besser für die Versuche geeignet(34). Im Hinblick auf eine zukünftige Anwendung am Menschen ist ein so starker Effekt mit einer damit verbundenen hohen Typ I Interferon Ausschüttung wahrscheinlich nicht wünschenswert.

In vivo zeichnen sich ODN als Adjuvans bei Impfstudien für Hepatitis B Vakzine durch eine stärkere und frühere Bildung von Immunglobulin aus. Von Infektionsmodellen ausgehend nimmt man allgemein an, dass insbesondere für eine effektive Bekämpfung von Viren eine TH-1 Antwort günstig ist. Anhand Maus-Modellen für Hepatitis-Vakzinierung konnte gezeigt werden, dass CpG ODN eine effektive TH-1 Antwort induzieren(17;43;65);. Möglicherweise liegt dem Erfolg der humanen Impfprotokolle mit CpG als Adjuvans ebenfalls dieser Effekt zugrunde.

Im Verlauf dieser Diskussion wurde schon im Zusammenhang mit der TH-1 Differenzierung auf die Fähigkeit von ODN hingewiesen, Typ I Interferon zu induzieren. Im weiteren Verlauf wird immer wieder auf zwei verschiedene Typen von ODN verwiesen werden. Deshalb an dieser Stelle einige kurze Worte zu ihrer Charakterisierung. Diese erwähnten unterschiedlichen ODN werden von unterschiedlichen Autoren mit anderen Namen bezeichnet. In einer Publikation ist z. B. von D und K ODN die Rede. Dabei sind K ODN durch Thymidin vor dem 5' Ende von CpG und TpT oder TpA am 3' Ende charakterisiert. Sie aktivieren Monozyten und B Zellen zur Sekretion von IL-6. Inzwischen ist es gebräuchlich, diese ODN als Typ B ODN zu bezeichnen. Typ D ODN hingegen haben Purin-Pyrimidin Dimere auf beiden Seiten von CpG – sie werden auch als Typ A ODN bezeichnet. Sie stimulieren NK Zellen zur IFN- γ Produktion(64). ODN 2006 gehört zu der ersten Gruppe von ODN die vor allem B-Zellen und Monozyten zur IL-6 Produktion stimulieren. Sie wurden zum Zeitpunkt der in dieser Dissertation dargestellten Versuche von allen Arbeitsgruppen verwendet. Der andere ODN Typ wird im weiteren von mir als ODN mit Fähigkeit zur Induktion großer Mengen IFN α und β von plasmazytoiden dendritischen Zellen bezeichnet

werden(31). Sie rückten mehr in den Vordergrund, nachdem die Bedeutung von TLR 9 und plasmazytoiden dendritischen Zellen für CpG Stimulation erkannt wurde.

5.2 Wirkung der ODN auf die NK Zell Funktion

Wie schon anfangs erwähnt beeinflussen ODN die Immunitätslage eines Organismus grundlegend. Sie induzieren ein typisches Zytokinmilieu und beeinflussen damit sämtliche Immunreaktionen. Auf Aspekte der T-Zell-Differenzierung und humoralen Immunreaktion wurde oben bereits hingewiesen. Beides sind Funktionen der adaptiven Immunantwort. Aber auch und gerade auf die angeborene Immunität, haben CpG ODN einen Einfluss. Schließlich hatte das Potential des BCG Vakzines die NK-Zell Zytotoxizität zu steigern erst zur Entdeckung der CpG ODN für die Immunologie geführt (vgl. Einleitung).

NK Zellen sind eine Subpopulation von Knochenmark gereiften T Zellen, die besonders in den frühesten Stadien der Pathogen Invasion eine kritische / entscheidende Funktion für die angeborene Immunität haben (12). Sie beeinflussen die Richtung der nachfolgenden Immunantwort und sind in der Lage, virusinfizierte Zellen, Parasiten oder MHC kontrolliert Tumor Zellen zu lysieren und Zytokine zu produzieren.

Trotz der großen Bedeutung der NK Zellen für die Funktionsfähigkeit des Immunsystems, sind diese Zellen bisher sehr uneinheitlich definiert. Sowohl bei der Isolation als auch bei der Färbung werden unterschiedliche Kriterien verwendet. So sind sie einmal als eine Unterpopulation der großen granulären Lymphozyten definiert(29), dann wieder als CD 16+ / CD56+ oder als CD56+ / CD3-/CD14-/CD19- oder jeweils Modifikationen dieser Gruppen. Das macht einen Vergleich von Daten unterschiedlicher Arbeitsgruppen äußerst problematisch und schwierig. Die Identifikation eines einheitlichen Markers würde die Analyse sehr vereinfachen. Von einer italienischen Arbeitsgruppe werden zur Analyse von NK Zellen Antikörper gegen den von ihnen definierten so genannten Komplex „natural cytotoxicity receptor“ (46), bestehend aus NKp46, NKp30 und NKp44 verwendet. Laut deren Aussage eignen sich NKp46(55) und NKp30(51) zur Definition der Zellen und kommen im Gegensatz zu CD16 und CD56 auf allen NK Zellen unabhängig vom Stimulationsgrad vor. Bisher sind Antikörper allerdings leider nicht erhältlich und werden von der Arbeitsgruppe auch nicht zur Kooperation bereitgestellt.

Nichts desto trotz sind NK Zellen entscheidende Effektoren einer ODN induzierten Immunantwort und es war von großem Interesse den Mechanismus ihrer Aktivierung näher zu untersuchen. Es gibt mehrere Parameter, die sich zur Beurteilung des Aktivitätszustands von

NK-Zellen eignen. Wie im Ergebnisteil dargestellt, wurden IFN- γ Produktion, CD 69 Expression und lytische Aktivität zur Untersuchung der NK Zell Aktivierung herangezogen.

5.2.1 IFN- γ Produktion

IFN- γ wird von NK Zellen nach Stimulation, also zum Beispiel nach Infektion des Organismus mit einem Virus produziert, es ist richtungweisend für die nachfolgende Immunantwort.

Die Abbildung 4.5.1 zeigt IFN- γ Produktion durch NK-Zellen nach Stimulation von PBMZ für 24h mit ODN 2006. Dabei kann im ELISA eine Tendenz zur Steigerung der IFN- γ Produktion durch ODN demonstriert werden, die durch anti Typ I Interferon Antikörper blockierbar ist (Daten nicht gezeigt). polyI:C diente in dem Versuch als Positivkontrolle; es eignet sich aufgrund seiner doppelsträngigen RNS Struktur und hohen Interferon alpha Induktion gut als Modell für eine Virusstimulation Da die Versuch an Zellen von Eigenblutspendern durchgeführt wurden, die normalerweise keine sehr homogene Population darstellen und auch hier eine sehr hohe Schwankungsbreite in der Responsivität zeigten, wurde in diesen Versuchen keine signifikanten Unterschiede ermittelt. Der Trend zu einer gesteigerten IFN- γ Produktion ist aber deutlich erkennbar. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Studien. In Japan konnten beispielsweise signifikante Ergebnisse für IFN γ Induktion von ODN stimulierten NK Zellen erzielt werden. Allerdings zeigt die Studie jeweils nur Daten eines von drei Donoren und verwendet gesunde Probanden und nicht Eigenblutspender. Die produzierten Mengen an IFN- γ liegen dabei im selben Bereich von ungefähr 100 pg/ml(29). Eine andere Arbeitsgruppe untersucht die IFN- γ Produktion von NK-Zellen mit Hilfe intrazellulärer Färbungen. Die Zellen stammen dabei von gesunden Blutspendern, Stimulation erfolgt in PBMZ Kultur und Analyse im FACS. Für ODN 2006 wird keine signifikante Steigerung der Mittleren Fluoreszenz Intensität von IFN- γ gezeigt, während andere ODN stärkere Zuwächse verzeichnen können(53)Es handelt sich dabei um ODN, die eine höhere IFN Typ 1 Produktion erreichen als 2006(34) und somit wahrscheinlich in der Lage sind, NK Zellen stärker zu stimulieren. Allerdings sind die NK Zellen in der Färbung als CD3- CD56 + Zellen charakterisiert und nicht etwa als CD 16+ CD 56+ oder CD56+ / CD3- CD19- CD14-. Die Prozentzahl der CD3-, CD 56+ Population innerhalb der PBMZ ist nicht angegeben und in dem abgebildeten FACS Zytogramm erscheint die Population auch ungewöhnlich groß. In den folgenden Abbildungen ist das Gesamtverhalten

der PBMZ durch gating nicht mehr beurteilbar. Dies erscheint problematisch, da erfahrungsgemäß nach Stimulation große Verschiebungen in den Zellpopulationen auftreten. Zusammenfassend steigern ODN die IFN- γ Produktion von NK Zellen, jedoch ist der Effekt im Fall von ODN2006 nicht signifikant.

5.2.2 CD 69 Expression

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung des Funktionszustand von NK Zellen ist der Oberflächenmarker CD 69, bei stimulierten NK Zellen findet sich mehr CD69 auf der Zelloberfläche.

Wie in 4.5.2 erwähnt, konnte eine Vermehrung von CD69 auf der Zelloberfläche zwar tendenziell beobachtet werden, allerdings war aufgrund der starken Veränderungen der Ausgangspopulationen nach Stimulation weder in CD16+, CD56+ Färbung noch anhand indirekter Färbung mit CD56+, CD3-, CD14-, CD19- eine eindeutige Beurteilung der Population und damit auch keine signifikante Aussage möglich. In dem bereits oben zitierten Artikel (53) ist ebenfalls eine Steigerung der CD69 Oberflächen Expression gezeigt. Aufgrund der unterschiedlichen Färbungsmethode und der Einschränkung der Darstellung auf die CD3-, CD56 positiven in dieser Arbeit, ist ein direkter Vergleich mit den eigenen Ergebnissen nicht möglich. Da allerdings nur ein repräsentativer Spender dargestellt ist und der Effekt für ODN 2006 beim Vergleich mehrerer ODN zwar signifikant jedoch am geringsten ist, steht zu bezweifeln, ob bei einer entsprechenden Färbung eindeutige Aussagen möglich wären. (53). Eine wahrscheinliche Erklärung für die geringe NK Zell Aktivierung von ODN 2006 gegenüber den anderen untersuchten ODN ist die weniger stark ausgeprägte Induktion von Typ I Interferon. Insbesondere in frühen Stadien einer Infektion mit Aktivierung des innatens Immunsystems, für die die NK Zell Aktivität in vitro exemplarisch untersucht wird, scheint Typ I Interferon eine sehr große und wichtige Rolle zu spielen (13). Zumindest in diesem Versuchsaufbau induziert 2006 in vitro wahrscheinlich zu geringe Mengen IFN 1 für eine signifikante Steigerung der IFN- γ und CD69 Expression, ob dies in vivo notwendigerweise wünschenswert ist oder evtl. sogar negativ Konsequenzen hätte, soll an einer anderen Stelle diskutiert werden.

5.2.3 NK Zellen und Zytotoxische Aktivität

Die herausragendste Funktion von NK Zellen ist ihre Fähigkeit, krankhaft veränderte Zellen zu erkennen und zu lysieren. Damit sind sie sehr wichtig, um z.B. bei Infektionen oder Tumorerkrankungen die Integrität des Organismus zu wahren.

Wie schon mehrfach erwähnt, hatte die Beobachtung, dass Bestandteile des BCG Impfstoffes in der Lage waren, die Antitumor Aktivität von NK Zellen zu steigern erst zur Analyse von BCG und damit zur Entdeckung der ODN geführt. Es steht also schon seit langem fest. ODN stimulieren die Aktivität von NK Zellen. Es blieb jedoch zu zeigen, dass auch ODN 2006 die NK Zell Zytotoxizität humaner PBMZ nach in vitro Stimulation steigern kann. In dem Zusammenhang sollte dann auch der Mechanismus der NK Zell Aktivierung näher untersucht werden.

NK Zell Zytotoxizität

Die meisten Informationen über die Funktionsweise von NK Zellen waren zum Zeitpunkt der Versuche an Maus Experimenten gewonnen worden und es liefen viele Versuche, die diese Informationen auch auf menschliche Modelle übertragen sollten.

Es war bekannt, dass zumindest in der Maus, die NK Zell Zytotoxizität von der Produktion verschiedener Zytokine stark beeinflusst wird. Zu diesen Zytokinen wurden insbesondere TNF- α , IL-12 und Interferon Typ α und β gerechnet.

Zytotoxizität von NK Zellen nach ODN Stimulation auf verschiedenen Target Zellen

NK Zellen können auf andere Zellen zytotoxisch wirken. Dabei stehen ihnen mehrere Mechanismen zur Verfügung. Zum einen bewirken sie eine CD16 (FcyRIII) abhängige Antikörper vermittelte Zytolyse, die der adaptiven Immunantwort zugerechnet werden kann. Zum anderen können sie die andere Zelle zur Apoptose veranlassen, wobei die Reaktion z.B. durch fas – fas Ligand vermittelt werden kann. Außerdem sind NK Zellen in der Lage Zielzellen Perforin abhängig zu lysieren. Man nimmt an, dass Perforin vermittelte Zytolyse den bedeutendsten Mechanismus der NK Zell Zytotoxizität darstellt(21).

NK Zellen sind im Gegensatz zu anderen zytotoxischen Zellen ständig aktiviert. Bei Kontakt mit anderen Zellen empfangen sie nicht wie die meisten anderen lytischen Zellen nur kostimulatorische Signale sondern werden zusätzlich durch verschiedene Rezeptor Ligand Interaktionen gehemmt. Erst wenn positive Signale mit dem Wegfall negativer Signale zusammentreffen, werden NK Zellen aktiviert. Bei humanen NK Zellen werden zu den hemmenden NK Zell Rezeptoren u. a. KIRs (killer cell inhibitory receptors), LIRs (leucocyte

inhibitory receptors) und NKG2 (ein Ca-abhängiges Lektin) gerechnet(10). Diese Rezeptoren interagieren mit MHC Klasse I Molekülen auf den anderen Zellen. Besitzt diese Zelle ein intaktes MHC Molekül, dann wird die NK Zelle gehemmt. Ist der MHC Komplex jedoch nur unvollständig vorhanden oder auf andere Weise pathologisch verändert, dann entfällt diese Inhibition und die andere Zelle wird zerstört.

In den unter 4.5.3 beschriebenen Versuchen dienten als Zielzellen K562, Daudi und B721. Die Zellen sind in 3.1.5.3-5 genau charakterisiert. K562 gelten als klassische NK Zell Zielzelle, während Daudis häufig als Kontrollen verwendet werden. Abbildungen 4.5.3.1-3 zeigen, dass ODN 2006 die zytotoxische Aktivität von NK Zellen gegen K562 und Daudi signifikant erhöht, während gegen B721 nur eine geringfügige Aktivitätszunahme verzeichnet wird. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, denn K562 sind Zellen einer hochgradig undifferenzierten Lymphomzelllinie, also stark verändert. Daudis sind Zellen eines Burkitt Lymphoms, sie werden in manchen Arbeiten als Kontrollzellen für NK Zell Versuche beschrieben, was problematisch erscheint, nachdem die Zelllinie kein β 2-Mikroglobulin exprimiert, also auch keinen intakten MHC Komplex besitzt. B-721 sind Zellen eines B-Zell-Lymphoms, das noch relativ gut differenziert ist und auf der Oberfläche stark MHC I und II exprimiert. B-721 sind also tatsächlich als Kontrollzellen für Versuche zur NK-Zell-Zytotoxizität geeignet. Das in Abb. 4.5.3.1-3 gezeigte Ergebnis bestätigt, dass die Zytotoxische Funktion von NK-Zellen durch CpG ODN verbessert wird. Die "veränderten" Zellen K562 und Daudi werden vernichtet, während die "normalen" B-721 nicht angegriffen werden. Es handelt sich also um eine selektive und differenzierte Steigerung der Zytotoxizität. Im Gegensatz dazu steigert das zur Positivkontrolle verwendete polyI:C, das große Mengen IFN induziert, die Zytotoxizität stärker und unselektiv.

5.2.3.1 Abhängigkeit der gesteigerten Zytotoxizität von ODN induzierten Zytokinen

Im Zusammenhang mit NK-Zell-Zytotoxizität werden immer wieder dieselben Zytokine als Einflussfaktoren diskutiert(13). Ein großer Einfluss auf die NK-Zell-Funktion wird dabei vor allem Interferon α und β , IL-12, TNF- α und IL-15 zugeschrieben (14;19;49). Kapitel 4.5.4 des Ergebnisteils beschreibt die Versuche, die die Bedeutung dieser Zytokine anhand Zytotoxizitätsassays untersuchen. Während der Stimulationsphase wurden dabei blockierende Antikörper eingesetzt, um die Bedeutung der entsprechenden Zytokine zu erfahren. Für TNF- α und IFN- γ wurde dabei ein Rückgang der Zytotoxizität beobachtet; diese Zytokine spielen jedoch für den ODN Effekt nur eine geringe Rolle und wurden daher nicht weiter untersucht.

Für IL-12 ließ sich kein einheitlicher Effekt zeigen (vgl. Abb. 4.5.4.1.1-2). In der Literatur finden sich Aussagen über die Bedeutung dieser Zytokine für die NK-Zell-Funktion nur an murinen Versuchsmodellen.

5.2.3.2 Abhängigkeit der gesteigerten Zytotoxizität von ODN induzierten Interferon α und β

Interferon α und β wird nach CpG ODN Stimulation in humaner PBMZ Kultur produziert. Als verantwortliche Zelle konnte die CD123+, plasmazytoide dendritische Zelle identifiziert werden(7). Im Bezug auf die NK Zell Zytotoxizität ergaben sich daraus drei Fragen: Hat Typ I Interferon einen Einfluss auf NK-Zell-Funktion? Welchen Beitrag leisten jeweils Interferon α und β ? Wie wirkt sich eine Depletion der Interferon produzierenden Zellen auf die NK-Zell-Zytotoxizität aus?

Hat Typ I Interferon einen Einfluss auf die NK-Zell-Zytotoxizität und welchen Beitrag leisten dazu jeweils Interferon α und β ?

Wie in Abb. 4.5.4.2.1 gezeigt, kann die Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen durch Zugabe von IFN α und β blockierenden Antikörpern während der Stimulationsphase vermindert werden. Dabei haben sowohl Interferon α als auch Interferon β blockierende Antikörper jeweils allein einen hemmenden Effekt auf die Zytotoxizität (vgl. Abb. 4.5.4.3.2.2-3). Wahrscheinlich ist der Effekt von Interferon α und β für die NK-Zell-Aktivität additiv. Die Ergebnisse sind jedoch nicht klar genug, um eine eindeutige Aussage treffen zu können.

Die Abhängigkeit der ODN induzierten NK-Zell-Zytotoxizität von Interferon α und β ist inzwischen mehrfach bestätigt. Im Einklang damit stehen z.B. die ein Jahr später publizierten Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe. Darin werden mehrere verschiedene ODN miteinander verglichen und es zeigt sich, dass ODN mit einer stärkeren Induktion von IFN α und β die Zytotoxizität von NK Zellen gegen K562 wesentlich stärker erhöhen als ODN 2006(34). Leider sind in dieser Veröffentlichung keine anderen Zielzellen als Kontrolle untersucht und man erfährt deshalb nicht, inwieweit die so stark gesteigerte NK-Zell-Zytotoxizität noch MHC kontrolliert erfolgt.

5.2.3.3 Wie wirkt sich eine Depletion der Interferon produzierenden Zellen auf die NK-Zell-Zytotoxizität aus?

Interferon α und β wird nach ODN Stimulation von CD 123+ dendritischen Zellen produziert, die auch als IL-3 R α + oder plasmazytoide dendritische Zellen bezeichnet werden(7). Nachdem die NK-Zell-Zytotoxizität durch IFN α und β blockierende Antikörper abgeschwächt werden kann, stellte sich die Frage, welchen Einfluss eine Depletion der CD 123+ auf die Stimulationsversuche hat. Abbildung 4.5.4.2.4 zeigt die Ergebnisse graphisch. Eine alleinige Depletion von CD123+ hat noch keinen Einfluss auf die Zytotoxizität. Die Stimulierbarkeit von PBMZ durch ODN wird mit CD123+ Depletion aufgehoben. Sowohl im unstimulierten als auch im stimulierten Zustand lässt sich die Zytotoxizität auch nach Depletion der CD123+ durch Zugabe von Interferon α und β blockierenden Antikörpern tendenziell noch weiter verringern. Auch der Effekt von polyI:C ist von CD123+ abhängig. Diese Feststellung passt in das Konzept, dass die CD 123+ dendritische Zelle, der Hauptvermittler der ODN Wirkung ist (7).

5.2.3.4 Sind stark Interferon α und β induzierende ODN besser als 2006?

In den letzten Paragraphen wurde wiederholt darauf hingewiesen, dass andere Arbeitsgruppen zu einem späteren Zeitpunkt mit anderen ODN „bessere“ Ergebnisse erzielen konnten. Es handelt sich dabei zum Beispiel um ODN 1585 und 2216. Diese ODN wurden im Zusammenhang mit der Aktivierung von NK Zellen genannt, da sie in der Lage sind, die IFN- γ Produktion zu steigern, die CD 69 Oberflächenexpression zu erhöhen und auch die Zytotoxische Aktivität zu verstärken(53). Alle genannten Effekte lassen sich auf die Fähigkeit dieser ODN zurückführen, bei PBMZ Stimulation große Mengen an Interferon α und β zu induzieren(34).

Bei Betrachtung dieser Aussagen stellt sich die berechtigte Frage, ob diese ODN schlichtweg besser zur Stimulation geeignet sein könnten als ODN 2006. Im Bezug auf die oben genannten Versuche, sind sie offensichtlich im Gegensatz zu 2006 in der Lage signifikante Ergebnisse zu erbringen. Dabei ist Vorsicht geboten und man darf nicht andere Aspekte nicht aus den Augen verlieren. Zum Beispiel ist 2006 stärker dazu befähigt, auf DZs und B-Zellen die Expression kostimulatorischer Moleküle zu erhöhen, damit die Zell-Zell Interaktion zu verbessern und eine koordinierte Immunantwort zu fördern. Zum weiteren hat der klinische Einsatz von Typ I Interferon z.B. im Zusammenhang mit der Therapie der Hepatitis C gezeigt, dass hohe Dosen Typ I Interferon durchaus großen Einfluss auf den Organismus haben und

zum Teil sehr starke und unerwünschte Nebenwirkungen zeitigen. Auch fehlen bei den oben genannten Studien zur NK Zell Aktivität Ergebnisse mit „gesunden Zellen“ zur Negativkontrolle und es ist im Moment nicht klar, ob die beschriebene Zytotoxizität denn dann noch MHC kontrolliert erfolgt.

In der Gesamtbeurteilung sollten diese Aspekte daher nicht überbewertet werden.

5.2.3.5 Die Bedeutung von IL-15

Ein weiteres Zytokin, das in der frühen Phase der unspezifischen, angeborenen Immunantwort eine entscheidende Rolle spielt ist IL 15(25). Es wird von vielen Zellen darunter Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen produziert, nicht jedoch von T-Zellen(36). Als Rezeptor nutzt es die β und γ Kette des IL-2 Rezeptors in Kombination mit einer eigenen α Kette(22;23). IL-15 erfüllt verschiedene Funktionen im Immunsystem. Es ist bei der Differenzierung von Dendritischen Zellen und NK Zellen aus hämatopoietischen Vorläuferzellen beteiligt(18). IL-15 steigert die Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen(16) und fördert Chemotaxis(66) und Proliferation. B-Zellen werden durch IL-15 zur Proliferation und Differenzierung kostimuliert(2). Auf Monozyten kommt es membrangebunden vor(48), wird aber auch z.B. bei chronisch entzündlichen Erkrankungen(44) oder Infektionen von Monozyten und Makrophagen sezerniert.

In der frühen Phase von Virusinfektionen spielt IL-15 eine wichtige Rolle, indem es NK-Zellen aktiviert. IL-15 stimulierte NK-Zellen sind besser in der Lage virusinfizierte Zellen zu eliminieren (24), weil IL-15 die NK-Zell-Zytotoxizität steigert. Auch die Zytotoxizität gegenüber K562 ist nach IL-15 Stimulation gesteigert.

Nachdem IL-15 im Zusammenhang mit Virusinfekten für die NK-Zell Zytotoxizität Bedeutung hatte, stellte sich die Frage, inwieweit es auch bei CpG Stimulation eine Rolle spielen könnte.

Zunächst sollte gezeigt werden, ob IL-15 durch ODN Stimulation in PBMZ Kultur gebildet wird.

Dazu wurde zunächst eine semiquantitative RT-PCR entwickelt (vgl. 3.4.3 im Material Teil). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5.4.3.1 und Abb. 4.5.4.3.1 dargestellt. Es konnte eine leichte Induktion von IL-15 mRNA nach CpG ODN Stimulation nachgewiesen werden. Die Induktion erschien eher gering, war jedoch bei häufiger Wiederholung immer unverändert vorhanden. Bei dem Versuch, das Ergebnis zu quantifizieren, ergab sich ein wenig mehr als Verdopplung der mRNA Menge nach CpG Stimulation.

Anfang dieses Jahres ist eine Publikation erschienen, die versucht mit Hilfe von Real Time PCR die Induktion von IL-15 durch CpG auf myeloiden dendritischen Zellen nachzuweisen. Dazu stimulieren sie Monozyten mit GM-CSF in Kombination mit entweder IL-4 (wie zur normalen Reifung) oder IFN- α oder Überständen von CpG behandelten PBMZ. Im Vergleich zu den anderen Bedingungen sieht man für GM-CSF und CpG Überstand das ungefähr 2,5 fachen an Kopien von IL-15(35). Das entspricht also dem oben geschilderten eigenen Ergebnis.

Ein reiner Nachweis der mRNA Induktion konnte jedoch noch keinerlei Aussage über die tatsächliche Bedeutung von IL-15 im Zusammenhang mit CpG ODN Stimulation machen. Wird die produzierte mRNA tatsächlich in Protein umgesetzt? Wenn ja, wird das Protein sezerniert, in Vesikeln gespeichert oder auf der Zelloberfläche exprimiert? Hat IL-15 für funktionelle Eigenschaften der PBMZ nach ODN Stimulation Bedeutung? Das alles blieb noch zu klären.

Auf Proteinebene war IL-15 damals schwierig nachzuweisen, weil der kommerziell erhältliche ELISA nur sehr wenig sensitiv war. Eine Alternative war der CTLL-2 Bioassay. Dabei wird IL-15 indirekt durch Wachstum einer IL-2 abhängigen Zelllinie nachgewiesen, die aufgrund der Ähnlichkeit des IL-2 und IL-15 Rezeptor auch in Gegenwart von IL-15 proliferiert. Abb. 4.5.4.3.3 zeigt das Ergebnis eines CTLL-2 Assays. Es ließ sich dabei IL-15 nachweisen, jedoch erwies sich die Methode bei mehrfacher Wiederholung als nicht zufrieden stellend zuverlässig.

Auch zum jetzigen Zeitpunkt finden sich im Zusammenhang von CpG Stimulation humaner PBMZ keine Publikationen, die IL-15 auf Proteinebene nachweisen.

Wie im Ergebnisteil ausgeführt war es nicht möglich durch Oberflächen- oder intrazelluläre FACS Färbung interessante Informationen über IL-15 Expression und Produktion nach CpG Stimulation zu gewinnen.

Es blieb also nur die Möglichkeit indirekt das Vorhandensein und die Bedeutung von IL-15 durch die Wirkung von blockierenden Antikörpern zu zeigen. Dazu wurde wie in Abb. 4.5.4.3.1 und 2 gezeigt ein NK Zell Zytotoxizitätsassay durchgeführt und blockierende Anti-IL-15 Antikörper zugegeben. Auch bei mehrfacher Wiederholung ließ sich für diesen Ansatz kein einheitliches Ergebnis ermitteln.

In der Literatur gibt es keinen Aufschluss über die Bedeutung von IL-15 im Zusammenhang mit CpG ODN vermittelter NK Zell Zytotoxizität. Im Zusammenhang mit NK Zellen wird IL-15 vornehmlich eine Rolle für die Reifung und die Proliferation zur Aufrechterhaltung eines ausreichenden Zellpools zugeschrieben. Außerdem soll IL-15 eine herausragende Rolle in der

Aktivierung von NK-Zellen bei Infektionen spielen(62). Im Bezug auf CpG ODN Stimulation gibt es inzwischen Hinweise, dass IL-15 nach ODN Stimulation die Reifung myeloider DZs fördert, die wiederum für die Aktivierung von CD8 T-Zellen verantwortlich gemacht werden(35).

Die letztendliche Antwort auf die Frage, welche Rolle IL-15 im Zusammenhang mit CpG vermittelter NK-Zell Aktivierung hat, steht also noch aus. Vielleicht ließe sie sich mit Hilfe stark IFN α und β induzierender CpG ODN klären. Diese ODN scheinen im Aktivierungsprofil einer Virusinfektion näher zu stehen, als 2006 und würden deshalb wahrscheinlich ein klareres Bild erzeugen.

Welche möglichen Anwendungen ergeben sich aus den beschriebenen Effekten von CpG ODN auf das humane Immunsystem für den Einsatz in der Medizin.

5.3 Potentielle Bedeutung von CpG-Oligonukleotiden für die Medizin

In Tierversuchen in Japan Anfang der 80er Jahre ergab sich kein Anhalt auf akute, subakute oder chronische Toxizität von BCG-DNS in therapeutischen Dosen. Weiterhin kein Anhalt für Einschränkung der Fertilität, keine Teratogenität, keine Auffälligkeiten in peri- und postnatalen Studien. Kein Anhalt für Mutagenität, keine Chromosomenaberrationen. Nach Injektion wurden keine anaphylaktischen Reaktionen beobachtet, es ließen sich keine anti-BCG-Antikörper nachweisen, bei intraartikulärer Injektion zeigte sich eine vorübergehende Arthritis(60).

In onkologischen Studien führt Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden zu einer Steigerung der zytotoxischen Aktivität von Natürlichen Killerzellen und damit, wie zu Beginn erwähnt, zu einer Erhöhung der Anti-Tumor Aktivität. Ein Einsatz in der Krebstherapie ist deshalb durchaus denkbar und wird in einigen Ländern auch praktiziert, sei es z.B. durch Instillation von BCG bei der Therapie des Blasenkarzinoms. Weiterhin laufen Versuche, metastasierende Melanome, intraepidermale Karzinome und kutane maligne Lymphome mit BCG Oligonukleotiden(30). Ein Einsatz zur Verbesserung der Rekonvaleszenz bei Chemotherapie wird im Tiermodell erprobt.

Ein weiteres denkbare Einsatzfeld für CpG-Oligonukleotide sind typische TH-2 Erkrankungen, wie Asthma und Allergien. Es ist nachgewiesen, daß Zellen allergischer

Individuen nach CpG-Oligonukleotid-Stimulation in vitro weniger IgE gegen spezifisches Allergen produzieren als vor Stimulation(15). Eine Redirektion vorhandener Fehlreaktionen im Bereich der Atopien und Allergien ist also denkbar.

In Phase I Klinischer Studie befindet sich ein anderer Ansatz, der die Immunstimulation durch CpG- Oligonukleotide zur Steigerung der Impfreaktion im Sinne eines Adjuvans ausnutzt. Dabei wurde der herkömmliche Hepatitis B Impfstoff Engerix B[®] mit CpG-Oligonukleotid kombiniert und zur Immunisierung verabreicht. Bisher zeigt sich dabei eine 100% Impferfolg-Rate für die neue Kombination bei 20% Non-Respondern in der Kontrollgruppe mit dem herkömmlichen Impfstoff. Der Antikörper Titer gegen HbS-Ag nach der Zweitinjektion liegt in der Versuchsgruppe 30mal höher als in der Kontrolle.

Für CpG ODN sind also vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Klinik denkbar. Unter welchen Indikationen CpG tatsächlich am Menschen zum Einsatz kommt, wird sich wohl erst in den nächsten Jahren herausstellen.

6 Zusammenfassung

Angeborenes und erworbenes Immunsystem wirken bei der Abwehr von Pathogenen zusammen. Dabei bestimmen Zellen des angeborenen Immunsystems durch Antigenpräsentation und durch die Produktion von Mediatoren und Zytokinen entscheidend die Antwort des adaptiven Systems. Bestimmte Strukturen des Pathogens, so genannte PAMPs (pathogen associated molecular patterns), werden dabei von einer gewissen Gruppe von Rezeptoren (PAMP recognition receptors) auf den Immunzellen eines Individuums erkannt. CG reiche DNS Abschnitte kommen bei Prokaryoten signifikant häufiger vor als bei Eukaryoten, bei denen CG Kombinationen nicht nur unterdrückt sondern auch zusätzlich durch Methylierung geschützt sind. Sie sind ein Beispiel für die genannten PAMPs und das Vorbild für immunstimulatorische CpG ODN. Erkannt werden die CG reichen Strukturen von einem spezifischen Rezeptor TLR-9(27). Aktivierung von TLR-9 durch CpG ODN führt in der Maus zu einer Aktivierung des Immunsystems. Sie zeigt sich in Zytokinproduktion, insbesondere von IL-12, IL-6, TNF- α , IFN α und β , B Zell Proliferation, Aktivierung von NK Zellen und Kostimulation CD 8 T-Zellen. T-Helfer-Zell Antworten werden in Richtung einer TH-1 Antwort beeinflusst.

In dieser Arbeit wurde der Effekt von CpG ODN auf humane PBMZ Kultur untersucht. Humane PBMZ produzieren nach Stimulation IL-12, IL-6, TNF- α , IFN α und β . T-Zell Antworten werden durch CpG ODN auch in humaner Zellkultur beeinflusst. Am Modell der Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) sollte eine Beeinflussung der T-Zell-Antwort in Richtung TH-1 gezeigt werden. In diesem Zusammenhang es gelang jedoch nur, eine CpG dosisabhängige Steigerung der Produktion von sowohl IFN- als auch von IL-4 nachzuweisen. Eine Differenzierung zur TH-1 Antwort war nicht erkennbar.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Funktion humaner NK-Zellen nach CpG Stimulation untersucht. Dabei konnte eine Steigerung der IFN- γ Produktion nach Stimulation nachgewiesen werden. Die Expression von CD69 auf der Zelloberfläche wurde durch 2006 nicht signifikant gesteigert. Die NK-Zell-Zytotoxizität gegen MHC-I veränderte Zellen wie K562 und Daudi wurde durch ODN 2006 signifikant verbessert, während sie gegen die weitgehend normale Zelllinie B721 nur schwach erhöht war. Es wurde anschließend untersucht, welche Zytokine für die Steigerung der NK-Zell-Zytotoxizität von Bedeutung waren. Dabei gab sich für IFN- γ , TNF- α und IL-12 kein klares Ergebnis. IL-15 mRNA schien nach CpG Stimulation von humaner PBMZ Kultur vermehrt gebildet zu werden, jedoch konnte keine klare Bedeutung für die NK-Zell Funktion ermittelt werden. Eine entscheidende

Rolle für die NK-Zell Zytotoxizität spielt jedoch IFN α und β . Durch blockierende Antikörper gegen IFN α und β konnte die Zytotoxizität stark vermindert werden und auch eine Depletion der IFN α und β produzierenden CD123+ dendritischen Zellen führte zu einer drastischen Verringerung der NK-Zell-Zytotoxizität. Die NK-Zell Funktion nach CpG ODN Stimulation ist demnach IFN α und β abhängig.

In der Zukunft werden CpG ODN wohl als Adjuvans bei der Immunisierung von Menschen gegen Antigen verwendet werden. Im Falle des Hepatitis B Antigens gibt es hierzu viel versprechende Ergebnisse. Inwieweit diese Ergebnisse sich auch auf die Vakzinierung gegen Tumor Antigene übertragen lassen, wird sich wohl erst in einiger Zeit herausstellen.

Eine weitere denkbare Anwendungsmöglichkeit liegt in der Therapie und Verhinderung von Allergien und Erkrankungen des atopischen Formenkreises. In diesem Zusammenhang liegen bisher aber nur wenige Ergebnisse in humaner Zellkultur vor. Eine klinische Anwendung wird also noch eine Weile auf sich warten lassen.

8 Literaturverzeichnis

1. Abbas AK. Cellular and Molecular Immunology. [4th ed 480 pp. illustrations hardback]. 2000. Harcourt Publishers Ltd, a subsidiary of Harcourt Inter. Ref Type: Generic
2. Armitage RJ, Macduff BM, Eisenman J, Paxton R, Grabstein KH. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J.Immunol.* 1995;483-90.
3. Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J.Immunol.* 1996;1840-5.
4. Bamford RN, Grant AJ, Burton JD, Peters C, Kurys G, Goldman CK, Brennan J, Roessler E, Waldmann TA. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;4940-4.
5. Bast RC Jr ZBBTRH. BCG and cancer. *N.Engl.J.Med.* 1974;1458-69.
6. Bauer M, Heeg K, Wagner H, Lipford GB. DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner. *Immunology* 1999;699-705.
7. Bauer M, Redecke V, Ellwart JW, Scherer B, Kremer JP, Wagner H, Lipford GB. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J.Immunol.* 2001;5000-7.
8. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;9237-42.
9. Bendigs S, Salzer U, Lipford GB, Wagner H, Heeg K. CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Eur.J.Immunol.* 1999;1209-18.
10. Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C, Moretta A. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol.Rev.* 2001;203-14.
11. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986;209-13.
12. Biron CA. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr.Opin.Immunol.* 1997;24-34.
13. Biron CA. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin.Immunol.* 1998;383-90.

14. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu.Rev.Immunol.* 1999;189-220.
15. Bohle B, Jahn-Schmid B, Maurer D, Kraft D, Ebner C. 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.* 1999;2344-53.
16. Borger P, Kauffman HF, Postma DS, Esselink MT, Vellenga E. Interleukin-15 differentially enhances the expression of interferon- gamma and interleukin-4 in activated human (CD4+) T lymphocytes. *Immunology* 1999;207-14.
17. Brazolot Millan CL, Weeratna R, Krieg AM, Siegrist CA, Davis HL. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;15553-8.
18. Bykovskaia SN, Buffo M, Zhang H, Bunker M, Levitt ML, Agha M, Marks S, Evans C, Ellis P, Shurin MR, Shogan J. The generation of human dendritic and NK cells from hemopoietic progenitors induced by interleukin-15. *J.Leukoc.Biol.* 1999;659-66.
19. Chace JH, Hooker NA, Mildenstein KL, Krieg AM, Cowdery JS. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1997;185-93.
20. Charles Janeway (Editor) PTJdCMJW. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* 1999. Garland Pub. 2-15-1999.
Ref Type: Generic
21. Colonna M. Specificity, Function, and Development of NK Cells. *NK Cells: The Effector Arm of Innate Immunity.* K.Kärre, M. Colonna. [230]. 1998. Kingston Mills, National University of Ireland, Maynooth, Springer-Verlag GmbH & Co. KG (1998). *Current Topics in Microbiology and Immunology.* RW Compans, MD Cooper Y Ito H Koprowski F Melchers S Olsnes M Potter PK Vogt H Wagner.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
22. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen A, Park LS, Cosman D, Anderson D. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* 1994;2822-30.
23. Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, Friend DJ, Loomis A, Shanebeck K, DuBose R, Cosman D, Park LS, Anderson DM. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.* 1995;3654-63.
24. Gosselin J, Tomoiu A, Gallo RC, Flamand L. Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response. *Blood* 1999;4210-9.
25. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdieh M, . Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994;965-8.

26. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells.
27. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;740-5.
28. Hirohata S. Human Th1 responses driven by IL-12 are associated with enhanced expression of CD40 ligand. *Clin.Exp.Immunol.* 1999;78-85.
29. Iho S, Yamamoto T, Takahashi T, Yamamoto S. 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.* 1999;3642-52.
30. Ishihara K, Ikeda S, Arao T, Mori S, Ohura T, Takahashi M, Kato T, Kukita A, Okamoto S, Hirone T, . [Evaluation criteria for chemotherapeutics for malignant skin carcinomas]. *Nippon Gan Chiryo Gakkai Shi* 1990;2609-20.
31. Kadowaki N, Antonenko S, Liu YJ. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN.
32. Kranzer K, Bauer M, Lipford GB, Heeg K, Wagner H, Lang R. 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* 2000;170-8.
33. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995;546-9.
34. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 2001;2154-63.
35. Krug A, Rothenfusser S, Selinger S, Bock C, Kerkmann M, Battiany J, Sarris A, Giese T, Speiser D, Endres S, Hartmann G. CpG-A oligonucleotides induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells. *J.Immunol.* 2003;3468-77.
36. Leclercq G, Debacker V, de Smedt M, Plum J. Differential effects of interleukin-15 and interleukin-2 on differentiation of bipotential T/natural killer progenitor cells. *J.Exp.Med.* 1996;325-36.
37. Liang H, Nishioka Y, Reich CF, Pisetsky DS, Lipsky PE. Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides.
38. Lipford GB, Bauer M, Blank C, Reiter R, Wagner H, Heeg K. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur.J.Immunol.* 1997;2340-4.

39. Lipford GB, Bendigs S, Heeg K, Wagner H. Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell- derived cytokines. *Immunology* 2000;46-52.
40. Lipford GB, Sparwasser T, Bauer M, Zimmermann S, Koch ES, Heeg K, Wagner H. Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur.J.Immunol.* 1997;3420-6.
41. Lipford GB, Sparwasser T, Zimmermann S, Heeg K, Wagner H. CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses. *J.Immunol.* 2000;1228-35.
42. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol.Today* 1990;237-44.
43. Malanchere-Bres E, Payette PJ, Mancini M, Tiollais P, Davis HL, Michel ML. CpG oligodeoxynucleotides with hepatitis B surface antigen (HBsAg) for vaccination in HBsAg-transgenic mice. *J.Virol.* 2001;6482-91.
44. McInnes IB, al Mughales J, Field M, Leung BP, Huang FP, Dixon R, Sturrock RD, Wilkinson PC, Liew FY. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat.Med.* 1996;175-82.
45. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002;298-300.
46. Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. What is a natural killer cell? *Nat.Immunol.* 2002;6-8.
47. Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur.J.Immunol.* 2002;1205-11.
48. Musso T, Calosso L, Zucca M, Millesimo M, Ravarino D, Giovarelli M, Malavasi F, Ponzi AN, Paus R, Bulfone-Paus S. Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood* 1999;3531-9.
49. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, Caligiuri MA, Durbin JE, Biron CA. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection.
50. Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, Tsang M, Cao X, Leonard WJ. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 1993;1877-80.

51. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Accame L, Malaspina A, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J.Exp.Med.* 1999;1505-16.
52. Peng X, Remacle JE, Kasran A, Huylebroeck D, Ceuppens JL. IL-12 up-regulates CD40 ligand (CD154) expression on human T cells. *J.Immunol.* 1998;1166-72.
53. Rothenfusser S, Hornung V, Krug A, Towarowski A, Krieg AM, Endres S, Hartmann G. Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta. *Eur.J.Immunol.* 2001;3525-34.
54. Shimada S, Yano O, Inoue H, Kuramoto E, Fukuda T, Yamamoto H, Kataoka T, Tokunaga T. Antitumor activity of the DNA fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. II. Effects on various syngeneic mouse tumors. *J.Natl.Cancer Inst.* 1985;681-8.
55. Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation.
56. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 1998;2045-54.
57. Sparwasser T, Vabulas RM, Villmow B, Lipford GB, Wagner H. Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell- independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur.J.Immunol.* 2000;3591-7.
58. Talmadge JE, Schneider M, Lenz B, Phillips H, Long C. Immunomodulatory and therapeutic properties of alkyl lysophospholipids in mice. *Lipids* 1987;871-7.
59. Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T, . Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J.Natl.Cancer Inst.* 1984;955-62.
60. Tokunaga T, Yamamoto T, Yamamoto S. How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn.J.Infect.Dis.* 1999;1-11.
61. Tokunaga T, Yano O, Kuramoto E, Kimura Y, Yamamoto T, Kataoka T, Yamamoto S. Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. *Microbiol.Immunol.* 1992;55-66.
62. Tran P, Ahmad R, Xu J, Ahmad A, Menezes J. Host's innate immune response to fungal and bacterial agents in vitro: up-regulation of interleukin-15 gene expression resulting in enhanced natural killer cell activity. *Immunology* 2003;263-70.
63. Vabulas RM, Pircher H, Lipford GB, Hacker H, Wagner H. CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses. *J.Immunol.* 2000;2372-8.

64. Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J.Immunol.* 2001;2372-7.
65. Weeratna RD, Brazolot Millan CL, McCluskie MJ, Davis HL. CpG ODN can re-direct the Th bias of established Th2 immune responses in adult and young mice. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 2001;65-71.
66. Wilkinson PC, Liew FY. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *J.Exp.Med.* 1995;1255-9.
67. Wilttrout RH, Salup RR, Twilley TA, Talmadge JE. Immunomodulation of natural killer activity by polyribonucleotides. *J.Biol.Response Mod.* 1985;512-7.
68. Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth.
69. Yamamoto T, Yamamoto S, Kataoka T, Komuro K, Kohase M, Tokunaga T. Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Jpn.J.Cancer Res.* 1994;775-9.
70. Yamauchi PS, Bleharski JR, Uyemura K, Kim J, Sieling PA, Miller A, Brightbill H, Schlienger K, Rea TH, Modlin RL. A role for CD40-CD40 ligand interactions in the generation of type 1 cytokine responses in human leprosy. *J.Immunol.* 2000;1506-12.
71. Yi AK, Chace JH, Cowdery JS, Krieg AM. IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides. *J.Immunol.* 1996;558-64.
72. Yi AK, Chang M, Peckham DW, Krieg AM, Ashman RF. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J.Immunol.* 1998;5898-906.
73. Yi AK, Peckham DW, Ashman RF, Krieg AM. CpG DNA rescues B cells from apoptosis by activating NFkappaB and preventing mitochondrial membrane potential disruption via a chloroquine-sensitive pathway. *Int.Immunol.* 1999;2015-24.
74. Yi AK, Tuetken R, Redford T, Waldschmidt M, Kirsch J, Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH- dependent generation of reactive oxygen species. *J.Immunol.* 1998;4755-61.

Danksagung:

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Hermann Wagner bedanken, der es mir ermöglichte, an seinem Institut meine Doktorarbeit zu machen und mich dabei unterstützte.

Ausserdem gilt mein Dank Dr. Grayson Lipford für die intensive Betreuung meiner Arbeit, die wissenschaftlichen Diskussionen und die Erarbeitung von Problemlösungen.

Ebenso möchte ich mich bei PD. Dr. Stefan Bauer für die Hilfe bei zahlreichen Fragen im Labor bedanken und bei Dr. Clarissa da Costa für viele Diskussionen.

Desweiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Susanne Hausmann, Franziska Ampfenberger und Tanja Gellert für die Hilfe im Labor und die Unterstützung bei Stundenplan bedingten Zeitengpässen.

Auch bei meinen Freunden ausserhalb des Labors und bei meiner Familie bedanke ich mich sehr für die Unterstützung und das Verständnis, ihnen weniger Zeit widmen zu können.

Allen ganz herzlichen Dank!

Barbara Scherer