

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

Zur Rolle von Toll-like-Rezeptoren bei der Immunisierung mit nackter DNA

Barbara Elisabeth Blank, geb. Spies

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des 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 10.05.2005 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.09.2005
angenommen.

für meine Eltern Paula und Konrad,
ohne sie wäre ich heute nicht da wo ich bin

Danksagung

Für die Unterstützung dieser Arbeit möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. Hermann Wagner für seine hervorragende Betreuung meiner Arbeit und dafür dass er trotz seiner vielen Aufgaben und Pflichten immer Zeit und ein offenes Ohr für mich und meine Sorgen hat.

Herrn Dr. Martin Vabulas für seine Unterstützung in Theorie und Praxis sowie seine Motivationsfähigkeit, selbst nach seinem Verlassen des Instituts.

Frau Dr. Antje Heit für ihre Unterstützung in Theorie und Praxis, konstruktive Kritik und viele gemeinsame kuchen- und plätzchenreiche Journal-Besprechungen.

Frau Monika Hammel für ihre kompetente Anleitung beim Erlernen der verschiedenen Techniken und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Allen im Wagner-Miethke Labor für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre während und außerhalb der Laborarbeit.

Frau Dr. Katharina Huster für ihre Hilfe bei den Proliferations-Assays.

Herrn PD Dr. Stefan Bauer und Herrn Dr. Hubertus Hochrein für die Unterstützung meiner Arbeit sowie der ganzen ‚Crew der Trogerstraße 32‘ für die Hilfe und angenehme Atmosphäre.

Abkürzungsverzeichnis

-/-:	gendefizient
+/+:	Wildtyp
Ag:	Antigen
Ak:	Antikörper
AP-1:	Activator Protein 1
APC:	Antigen-Präsentierende Zelle
BCG:	Bacillus Calmette Guérin
BCR:	B-Zell-Rezeptor
BMD-DC:	Bone Marrow Derived DC (aus dem Knochenmark)
CD:	Cluster of Differentiation (Oberflächenmarker)
cDC:	konventionelle DC
CFA:	Komplettes Freund'sches Adjuvans
CpG:	Basensequenz: Cytosin – Guanin, verbunden über eine Phosphatbrücke
CTL:	Zytotoxischer T-Lymphozyt
DC:	dendritische Zelle
pDC:	plasmazytoide DC
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA:	doppelsträngige DNA
pDNA:	Plasmid-DNA
ssDNA:	einzelsträngige DNA
ECSIT:	Evolutionary Conserved Signaling Intermediate in Toll Pathways
FACS:	Fluorescence-Activated Cell Sorting
HSP:	Hitze-Schock-Protein
IL:	Interleukin
IFN:	Interferon
I κ BK:	Inhibitor of κ B Kinase
IRAK:	IL-1-R Associated Kinase
JNK:	c-Jun N-terminal Kinase
ko:	Knockout
LPB:	LPS-bindendes Protein
LPS:	Lipopolysaccharid
LRR:	Leucin Rich Repeats
MHC:	Major Histocompatibility Complex
MAPK:	Mitogen Activated Protein Kinase

Abkürzungsverzeichnis

MEKK1:	MAP-3 Kinase
MyD88:	Myeloid Differentiation Marker 88
NFκB:	ursprünglich: Nuclear factor, notwendig für die Transkription von der leichten Immunglobulin κ Kette in B-Zellen
NIK:	NFκB Inducing Kinase
NKC:	natürliche Killerzelle
ODN:	Oligonucleotid
OVA:	Ovalbumin
RNA:	Ribonucleinsäure
dsRNA:	doppelsträngige RNA
RT:	Raumtemperatur
PAMP:	Pathogen Associated Molecular Pattern
PRR:	Pattern Recognition Receptor
TAK-1:	Tumor Growth Factor β Activated Kinase
TCR:	T-Zell-Rezeptor
T _H L:	T-Helfer-Zelle
TIR:	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TIRAP:	TIR domain containing Adaptor Protein
TIRAP/Mal:	TIR domain-containing Adaptor Protein/ MyD88-daptor-like
TLR:	Toll-like-Rezeptor
hTLR:	humaner TLR
mTLR:	muriner TLR
TNF:	Tumor Nekrose Faktor
TRAF6:	TNF Receptor Associated Factor 6
wt:	Wildtyp

1	Einleitung	9
1.1	Das Immunsystem	9
1.2	Das unspezifische Immunsystem	10
1.2.1	Pattern Recognition Receptors (PRRs) und Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs)	10
1.2.2	Lipopolysaccharid (LPS).....	11
1.2.3	Toll-like-Rezeptoren (TLRs).....	11
1.3	TLRs und ihre Liganden.....	12
1.3.1	Toll-like-Rezeptor 1, 2 und 6 (TLR1, TLR2, TLR6).....	12
1.3.2	Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3).....	13
1.3.3	Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4).....	13
1.3.4	Toll-like-Rezeptor 5 (TLR5).....	14
1.3.5	Toll-like-Rezeptor 7, 8 und 10 (TLR7, TLR8 und TLR10).....	14
1.3.6	Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9).....	14
1.4	Die TLR-Signalkaskade	16
1.5	TLR9 und CpG-DNA	18
1.5.1	CpG und Dendritische Zellen.....	18
1.5.2	CpG und Makrophagen	19
1.5.3	CpG und B-Zellen	19
1.5.4	CpG und T-Zellen	20
1.5.5	CpG und Natürliche Killer Zellen.....	20
1.5.6	CpG als Adjuvans bei Vakzinierung.....	20
1.6	Fragestellung	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Versuchstiere	24
2.2	Zellkulturen	24
2.3	Plasmide	25
2.4	Transformation	25
2.4.1	Material/ Reagenzien Transformation.....	25
2.4.2	Protokoll Transformation	26
2.5	Plasmidaufreinigung.....	26
2.5.1	Material/ Reagenzien Plasmidaufreinigung	26
2.5.2	Protokoll Plasmidaufreinigung.....	27

Inhaltsverzeichnis

2.6	Transfektion.....	28
2.6.1	Material Transfektion.....	28
2.6.2	Protokoll Transfektion.....	28
2.7	Präsentations-Assay.....	28
2.7.1	Material/ Reagenzien Präsentations-Assay.....	29
2.7.2	Protokoll Präsentations-Assay.....	29
2.8	Western Blot.....	29
2.8.1	Material/ Reagenzien Western Blot.....	30
2.8.2	Antikörper für Western Blot.....	32
2.8.3	Zelllyse für Western Blot.....	33
2.8.4	Protokoll Western Blot.....	33
2.8.5	Strippen eines Western Blots.....	35
2.9	Immunisierung.....	35
2.9.1	Material/ Reagenzien Immunisierung.....	35
2.9.2	Immunisierungsprotokoll.....	35
2.10	Organgewinnung und in vitro Restimulation.....	36
2.10.1	Material/ Reagenzien Organgewinnung und in vitro Restimulation.....	36
2.10.2	Protokoll Organgewinnung und in vitro Restimulation.....	36
2.11	CTL-Assay.....	37
2.11.1	Material/ Reagenzien CTL-Assay.....	37
2.11.2	Protokoll CTL-Assay.....	37
2.12	Generierung von B-Zellen aus der Milz.....	38
2.12.1	Material/ Reagenzien Generierung von B-Zellen.....	38
2.12.2	Protokoll B-Zell-Generierung.....	39
2.13	Generierung von Dendritischen Zellen (DCs) aus dem Knochenmark.....	40
2.13.1	Material/ Reagenzien Generierung von DCs.....	40
2.13.2	Protokoll Generierung von DCs.....	40
	Stimulation und Durchflusszytometrie (FACS) von B-Zellen und DCs.....	41
2.14.1	Stimulation.....	41
2.14.2	Material/ Reagenzien FACS-Färbung.....	41
2.14.3	Protokoll FACS-Färbung.....	42
2.15	ELISA (Enzyme linked immunoabsorbent assay).....	43
2.15.1	Material/ Reagenzien ELISA.....	43
2.15.2	Protokoll ELISA.....	44

3	Ergebnisse	46
3.1	Plasmid-Expression	46
3.2	Präsentation des Plasmidprodukts	47
3.3	Etablierung eines Vakzinierungsprotokolls	49
3.4	Zytokinproduktion nach Stimulation mit pDNA	54
3.5	Induktion kostimulatorischer Oberflächenmoleküle durch Plasmid-Stimulation	59
3.6	Mitogenität von Plasmid-DNA	62
3.7	Plasmid-DNA aktiviert DCs via TLR9	63
3.8	TLR9-unabhängige CTL-Induktion nach Plasmidimmunisierung	66
3.9	Tetramer-Staining SIINFEKL-spezifischer CTLs	68
4	Diskussion.....	70
4.1	pC-OVA und pFLAG-OVA.....	70
4.2	Zytokinproduktion und Expression kostimulatorischer Moleküle durch Wildtyp-Zellen in vitro.....	72
4.3	Vergleich von TLR9 ^{-/-} und TLR9 ^{+/+} bezüglich B-Zell-Proliferation, DC-Zytokinproduktion und DC-Oberflächenmarker	73
4.4	CTL-Induktion durch Plasmid-Stimulation bei TLR9-gendefizienten Mäusen	75
4.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	76
5	Zusammenfassung	78
6	Literaturverzeichnis	79

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

In allen vielzelligen Organismen gibt es ein komplexes Zusammenspiel von Zellen und Molekülen, welches deren stoffliche Individualität sichert und Immunsystem genannt wird. Die wichtigste Aufgabe dieses Netzwerkes ist es ‚selbst‘ von ‚fremd‘ zu unterscheiden, das ‚Fremde‘ auszuschalten und ein Gedächtnis für dessen Merkmale zu entwickeln um bei einer Sekundärexposition eine schnellere Antwort zu ermöglichen. Es basiert auf zwei verschiedenen Mechanismen: der erworbenen, spezifischen und der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr. Erstere umfasst B-Lymphozyten, die nach Aktivierung durch ein Antigen (Ag) spezifische Antikörper (Ak) bilden, zytotoxische T-Lymphozyten (CTL, CD8+), die mit Viren oder Bakterien infizierte Zellen oder Tumorzellen erkennen und deren Lyse vermitteln und T-Helfer-Zellen (T_HL , CD4+), die Hilfsaufgaben ausführen. Bei der Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen (APC) wie Makrophagen oder dendritische Zellen (DC) differenzieren sich T_HL in die Untergruppen T_H1 und T_H2 und produzieren Zytokine, die die Art der Immunantwort beeinflussen (T_H1 : vor allem Interferon $IFN\gamma$; T_H2 : Interleukin IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13). Dabei ist das von T_H1 -Zellen sezernierte $IFN-\gamma$ wichtig für die weitere T_H1 -Differenzierung (bei Infektionen mit Mikroben, die Makrophagen oder NKC's aktivieren) notwendig und inhibiert die Proliferation von T_H2 -Zellen. Dagegen induziert das von T_H2 -Zellen synthetisierte IL-4 die weitere T_H2 -Differenzierung (bei Wurmbefall oder Allergien), während IL-10 die Aktivierung von T_H1 -Zellen verhindert. Für die Erkennung des Antigens sind T- und B-Zell-Rezeptoren (TCR und BCR) verantwortlich, die durch sogenanntes zufälliges Rearrangement für verschiedenste Antigene vorliegen. Auf die Bindung eines Antigens folgen die klonale Selektion und Expansion dieses rezeptortragenden Zellklons. Im Verlauf einer Immunantwort können sowohl B- als auch T-Zellen zu antigenspezifischen Gedächtnis (Memory)-Zellen differenzieren. Diese persistieren im Organismus über lange Zeiträume und vermitteln eine stärkere und schnellere sekundäre Abwehrreaktion bei Reexposition mit dem gleichen Antigen. Lange Zeit war in der immunologischen Forschung umstritten wie die Induktion einer Immunantwort möglich ist und wie die adaptive Immunantwort mit ihren zufällig generierten Ag-Rezeptoren in der Lage ist den Ursprung und den biologischen Zusammenhang des für sie spezifischen Antigens zu erschließen.

Das unspezifische Immunsystem spielt dabei während der Initial- und Frühphase einer Infektion eine wichtige Rolle. Zu den Hauptkomponenten der angeborenen Immunabwehr zählen: physikalische und chemische Barrieren wie Epithelien und an deren Oberfläche produzierte antimikrobielle Substanzen, phagozytierende Zellen (Granulozyten, Makrophagen), dendritische Zellen (DCs) und natürliche Killerzellen (NKC), Komplementfaktoren und Zytokine. Letztere sind Botenstoffe, die die Immunantwort regulieren und koordinieren. Bei der initialen Erkennung durch das angeborene Immunsystem kommt es zur Aufnahme (Phago- oder Endozytose) und Zerstörung eines Pathogens, sowie zur Aktivierung der unspezifischen Immunzellen. Dabei wird die Expression kostimulatorischer Zelloberflächen- und MHC (Major Histocompatibility Complex) Klasse I und II Moleküle, die Ausschüttung proinflammatorischer ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$) und effektorischer (Interleukin-12, Typ I Interferon) Zytokine und die Antigen-Präsentation via MHC hochreguliert.

1.2 Das unspezifische Immunsystem

1.2.1 Pattern Recognition Receptors (PRRs) und Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs)

Die initiale Erkennung eines Pathogens und die Aktivierung der unspezifischen Immunzellen finden durch die Stimulation sogenannter PRRs (Pattern Recognition Receptors) statt. Über PRRs erkennen die Komponenten des unspezifischen Immunsystems Strukturen, die bestimmte molekulare Muster mikrobieller Pathogene, die man auch als PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) bezeichnet, darstellen (Janeway, 1989; Janeway and Medzhitov, 1998). Es handelt sich dabei um während der Evolution konservierte Moleküle, die für die Funktion des Pathogens unabkömmlich sind. PAMPs sind zum Beispiel Zellwandbestandteile wie das Mannan der Hefezellwand, Lipopolysaccharid (LPS) der gramnegativen Bakterien, Lipoproteine, Peptidoglykane. Außerdem fungiert Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit unmethylierten CpG-Motiven als PAMP. PAMPs kommen sowohl bei pathogenen als auch bei nicht-pathogenen Mikroorganismen vor, wobei die Toleranzmechanismen des Immunsystems gegenüber nicht-pathogenen Keimen noch weitestgehend unklar sind. Die wichtigsten Eigenschaften dieser Molekülmuster sind Folgende: PAMPs werden nur von mikrobiellen Erregern und nicht von den Wirtszellen gebildet; dies begünstigt die Unterscheidung in ‚selbst‘ und ‚fremd‘. Des Weiteren können sie sich innerhalb der einzelnen Klassen nicht verändern, was bedeutet, dass nur eine begrenzte Anzahl an PRRs notwendig ist um eine Infektion erkennen zu können (zum Beispiel ein PRR für LPS, der aber Infektionen durch verschiedene gram-negative Bakterien erkennen

kann). Außerdem sind diese spezifischen Moleküle unabdingbar für das Überleben der Mikroorganismen. Verlust oder Veränderungen der PAMPs führen zum Absterben der jeweiligen Klasse bzw. vermindern ihre Funktion so sehr, dass keine durch PRRs nicht erkennbaren Mutanten entstehen können. Moleküle, die an PRRs binden, werden entweder durch Phagozytose in die Immunzellen aufgenommen oder induzieren unmittelbar via Rezeptor ein transmembranes Signal und führen am Ende zu einer Aktivierung der PRR-tragenden Zelle.

Durch den Mechanismus der direkten Pathogen-Erkennung durch die PRR-tragenden Zellen des angeborenen Immunsystems werden das unspezifische und das spezifische Immunsystem eng miteinander verknüpft.

1.2.2 Lipopolysaccharid (LPS)

LPS ist das bisher am besten untersuchte PAMP. Es handelt sich dabei um einen Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien bestehend aus Polysacchariden und Lipid A. Diesem Lipid A schreibt man verschiedene immunstimulatorische Eigenschaften wie die Induktion von IL-12- oder die Stickoxid (NO)-Produktion zu. Neben lokalen Entzündungserscheinungen kann LPS bei systemischer Ausschwemmung lebensbedrohliche Endotoxin-Schocks verursachen.

Lange Zeit galt LPS als Initiator des Immunsystems, dem aber keine intrazelluläre Signalkette zugeordnet werden konnte. Erst die Entdeckung der Toll-like-Rezeptoren führte zur Entschlüsselung der Frage nach dem initialen Aktivierungsmechanismus des Abwehrsystems.

1.2.3 Toll-like-Rezeptoren (TLRs)

Toll-like-Rezeptoren zählen zu den PRRs und spielen zu Beginn der Immunantwort eine wichtige Rolle bei der Pathogen-Erkennung. Es handelt sich um Transmembran-Proteine, deren extrazelluläre Komponente aus leucin-reichen repetitiven Sequenzen (Leucin rich repeat = LRR) besteht. Der intrazelluläre Anteil besteht aus der sogenannten Toll/Interleukin 1-Rezeptor (=TIR)-Domäne (Whitham et al., 1994). Diese Domäne ist charakteristisch für viele transmembrane und zytoplasmatische Proteine, die seit frühesten Entwicklungsstufen bei Pflanzen, Insekten und Wirbeltieren von Bedeutung waren. Wie der Name vermuten lässt findet man TIR auch im intrazellulären Bereich der IL-1 Rezeptor Familie. Anstelle der extrazellulären LRRs der TLRs haben die IL-1 Rezeptoren drei Immunglobulin ähnliche Abschnitte. Bei Säugetieren kommen TIRs unter anderem in zwei für die TLR-Signaltransduktion wichtigen zytoplasmatischen Molekülen, MyD88 (Burns et al., 1998; Medzhitov et al.,

1998; Muzio et al., 1997; Wesche et al., 1997) und TIRAP (TIR domain-containing Adaptor Protein) (Horng et al., 2001) vor.

Als erstes Mitglied der Toll-Familie wurde 1988 Drosophila-Toll entdeckt (Hashimoto et al., 1988). Es handelt sich dabei um ein Gen der Fruchtfliege Drosophila, das sowohl die dorsoventrale Polarisierung bei Fruchtfliegen-Embryos, als auch die Immunität gegenüber Pilzen bei erwachsenen Fliegen kontrolliert (Lemaitre et al., 1996). Die Sequenzierung des Drosophila Genoms zeigte inzwischen, dass neun Proteine existieren, die der Toll-Familie zuzuordnen sind (Tauszig et al., 2000).

1.3 TLRs und ihre Liganden

Bei Säugern wurde bis heute gezeigt, dass zehn humane und neun murine Transmembran-Proteine der Gruppe der Toll-like-Rezeptoren zuzuordnen sind (Chuang and Ulevitch, 2001; Hemmi et al., 2000; Rock et al., 1998; Takeuchi et al., 1999b). Ein Überblick der bis dato identifizierten TLRs und ihrer Liganden ist in Abbildung 1 dargestellt und im Folgenden beschrieben.

Abbildung 1

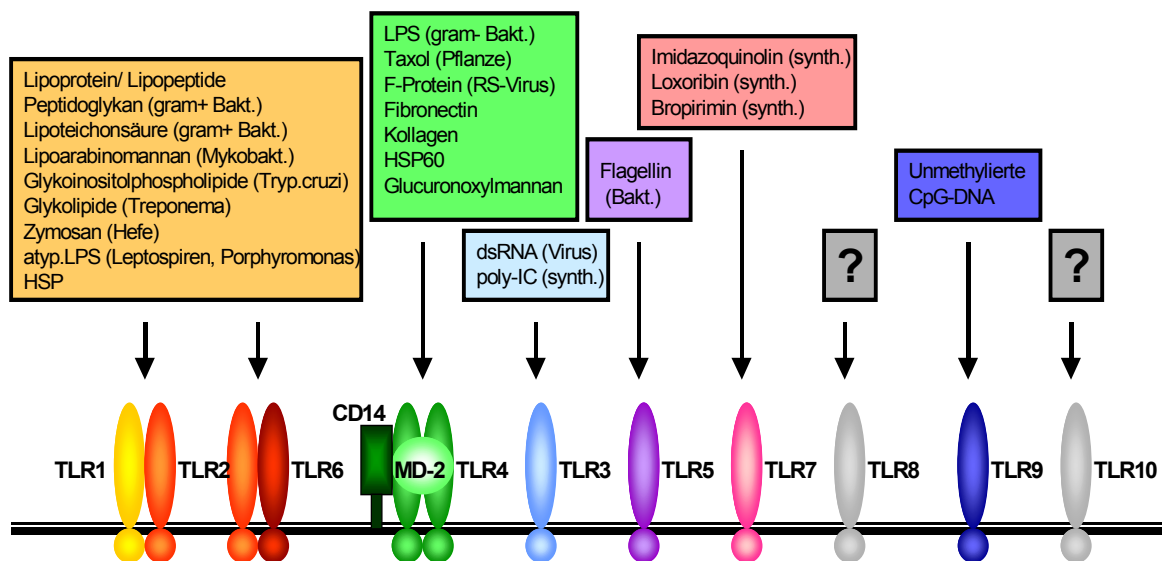


Abb.1: Schemazeichnung der Toll-like-Rezeptoren 1-10 und ihrer Liganden

1.3.1 Toll-like-Rezeptor 1, 2 und 6 (TLR1, TLR2, TLR6)

Ein breites Spektrum an PAMPs gram-positiver sowie gram-negativer Bakterien wird durch Toll-like-Rezeptor 2 erkannt. Dazu gehören Lipoproteine von Borellien, Treponema, Mycoplasmen und Mycobacterium tuberculosis (Akira et al., 2001;

Aliprantis et al., 1999; Brightbill et al., 1999; Takeuchi et al., 1999a; Takeuchi et al., 2000a), Peptidoglykane (Schwandner et al., 1999), Glykolipide und Lipoteichonsäure (Opitz et al., 2001), Zellwandbestandteile der Hefe (Underhill et al., 1999), atypisches LPS von Leptospiren (Werts et al., 2001) und HSP (Heat-Shock-Protein) (Vabulas et al., 2001). Diese ungewöhnlich große Bandbreite an TLR2-Liganden lässt sich zumindest teilweise zurückführen auf die Heterodimerisation von TLR2 mit TLR1 oder TLR6 (Ozinsky et al., 2000; Takeuchi et al., 2001). Dabei werden TLR1 und 6 im humanen System auf vielen verschiedenen Zellen exprimiert, während TLR2 nur auf APCs und Endothelzellen exprimiert wird (Muzio et al., 2000). Man nimmt an, dass diese unterschiedlichen Expressionsmuster eine Erkennung des Antigens und somit eine Beeinflussung der Regulation und Kontrolle der Immunabwehr ermöglichen.

1.3.2 Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3)

Doppelsträngige Ribonucleinsäure (dsRNA) (Alexopoulou et al., 2001), die von vielen Viren, aber keiner Wirtszelle gebildet wird, und ihr synthetisches Analogon Polyinosin-Polycytosin (poly IC) wird von Toll-like-Rezeptor 3 erkannt. TLR3 wird überwiegend von dendritischen Zellen exprimiert (Muzio et al., 2000) und nicht wie die meisten TLRs auf Monozyten bzw. Makrophagen.

1.3.3 Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4)

1997 fand Janeway's Arbeitsgruppe als erstes ein humanes Toll Homolog (heute bekannt als TLR4) und konnte ihm die Induktion von Zytokin-Produktion und die Expression kostimulatorischer Moleküle zuschreiben (Medzhitov et al., 1997). TLR4 dient als Signal-Transduktions-Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien. Entdeckt wurde der Signalweg durch positionelles Klonen des LPS-Gens in der C3H/HeJ Maus, die auf Grund einer Punktmutation (Histidin statt Prolin) in der TLR4 TIR Domäne nicht auf LPS reagiert (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999). Die Bestätigung erfolgte im Anschluss daran durch Versuche mit einer TLR4-gendefizienten Maus (Hoshino et al., 1999).

LPS bindet zunächst an das Serumprotein LBP (LPS-bindendes Protein) (Wright et al., 1989), das LPS-Monomere an CD14 (Wright et al., 1990) weiterleitet. Zum LPS Rezeptorkomplex zählt auch ein kleines Protein namens MD-2, das sich an der extrazellulären Domäne von TLR4 anlagert (Shimazu et al., 1999) und dessen Funktion man noch nicht genau kennt. Interessanterweise kann dieser TLR4-Komplex in der Maus nicht nur LPS, sondern auch andere Komponenten erkennen. Dazu zählen zum Beispiel exogene Liganden wie das Pflanzenprodukt Taxol, das weitläufig in der

Krebstherapie eingesetzt wird (Kawasaki et al., 2000), Glucuronoxylmannan, ein Kapselbestandteil von *Cryptokokkus neoformans* (Shoham et al., 2001) oder das F-Protein des Respiratory Syncytial (RS) Virus (Kurt-Jones et al., 2000), aber auch endogene Liganden wie Hitze-Schock-Protein 60 (HSP60) (Means et al., 1999; Ohashi et al., 2000; Vabulas et al., 2001) und zelluläre Matrix-Komponenten wie Fibronectin oder Kollagen (Okamura et al., 2001). TLR4 wird von verschiedenen Zellen exprimiert, allen voran von Makrophagen und DCs (Medzhitov and Janeway, 1997).

1.3.4 Toll-like-Rezeptor 5 (TLR5)

Flagellin, ein wichtiges Protein für die Mobilität von Bakterien, wird durch TLR5 erkannt (Hayashi et al., 2001). Flagellin von *Escherichia coli* oder Salmonellen kann eine NF κ B-Aktivierung von murinen Makrophagen (Eaves-Pyles et al., 2001) und eine IL-8 Freisetzung von intestinalen Epithelzellen (Steiner et al., 2000) induzieren. TLR5 wird auf intestinalen Epithelien (Gewirtz et al., 2001) und myelomonocytyären Immunzellen (Muzio et al., 2000) exprimiert.

1.3.5 Toll-like-Rezeptor 7, 8 und 10 (TLR7, TLR8 und TLR10)

Während für TLR7, TLR8 und TLR10 noch keine natürlich vorkommenden Liganden identifiziert werden konnten, wurden für TLR7 zumindest synthetische Derivate der Imidazoquinolin-Gruppe, wie Imiquimod oder Resiquimod (Hemmi et al., 2002), die im Tiermodell gute antivirale und Antitumor-Eigenschaften zeigten (Miller et al., 1999), als Liganden beschrieben. Peritoneale Makrophagen von Wildtyp-Mäusen bildeten als Reaktion auf Imidazoquinoline TNF- α , IL-6 und IL-12. Des Weiteren wurden zwei weitere Immunmodulatoren, nämlich Loxoribin und Bropirimin als TLR7-Liganden identifiziert (Akira and Hemmi, 2003).

1.3.6 Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9)

Auch bakterielle Desoxyribonukleinsäure (DNA) dient als PAMP. Grundlage für diese Entdeckung legten Tokunaga et al. (Tokunaga et al., 1984), als sie vor 20 Jahren immunstimulatorische Aktivität in DNA-Extrakten von *Bazillus Calmette Guérin* (BCG) fanden. Dazu zählte die Wachstumshemmung verschiedener syngener Tumoren bei Tieren, die Steigerung der NKC-Aktivität und die Induktion von IFN α / β und IFN γ aus Milz-Zellen der Maus und humanen peripheren B-Lymphozyten. Im weiteren Verlauf der Forschung konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt auf sogenannten CpG-Motiven (Cytosin-Phosphatbindung-Guanin) innerhalb der DNA-Sequenz beruht (Krieg et al., 1995; Lipford et al., 1997). Diese Motive kommen

besonders häufig in bakterieller DNA vor. In prokaryotischer DNA ist durchschnittlich jedes 16. Dinucleotid CpG (Bird, 1986), während es im Vertebraten-Genom erheblich seltener (ca. viermal seltener) vorkommt. Einen weiteren wichtigen strukturellen Unterschied bakterieller DNA stellt deren Methylierungszustand dar. Die bakterielle Nucleinsäure liegt in der Regel unmethyliert vor (Bird, 1986), was von funktioneller Bedeutung ist. Krieg bewies, dass einzelne hinzugefügte Methyl-Reste im CpG-Motiv die Immunfunktion des bakteriellen Genoms ausschalteten (Krieg et al., 1995).

Akiras Arbeitsgruppe zeigte, dass die Effekte (wie Zytokin-Produktion von Makrophagen, B-Zell-Proliferation, DC-Maturierung und die Induktion eines systemischen Schocks) von CpG-DNA (bakterielle Plasmid DNA sowie synthetisch hergestellte Oligodinucleotide (ODN)) in TLR9-gendefizienten Zellen und Mäusen aufgehoben waren (Hemmi et al., 2000). Diese Ergebnisse bewiesen erstmals, dass die Immunantwort auf CpG-DNA via TLR9 vermittelt wird.

Auf der Suche nach optimal stimulierenden CpG-Motiven fand man heraus, dass es verschiedene Formen immunstimulatorischer CpG-ODNs gibt (Kadowaki et al., 2001a; Lipford et al., 1997; Lipford et al., 2000a; Sester et al., 2000; Sun et al., 1998b; Verthelyi et al., 2001; Yamamoto et al., 1992). Die heute als A-Form (CpG-A-ODN) bezeichnete CpG-DNA besteht aus G-reichen Sequenzen an den Enden und einem Phosphodiester Palindrom mit einem CpG-Dinucleotid in der Mitte (Ballas et al., 1996). Sie aktiviert vor allem NK-Zellen und induziert die IFN- α Produktion durch plasmazytoide DCs (Ballas et al., 1996; Kadowaki et al., 2001a; Krieg, 2001; Krieg et al., 1996; Krug et al., 2001a; Vallin et al., 1999). CpG-B-ODN dagegen hat eine vollständige Phosphorothioat-Rückgratstruktur mit mindestens einem CpG-Dinucleotid und keinem Poly G Motiv (Krieg, 2001). Die B-Form kann die B-Zell-Proliferation stimulieren und induziert die IL-6 und IL-12 Produktion der Monozyten (Ballas et al., 1996; Boggs et al., 1997; Stacey et al., 1996).

An unserem Institut wurde gezeigt, dass sowohl der humane TLR9 (hTLR9), als auch der murine TLR9 (mTLR9) spezies-spezifische CpG-Motive für die Initiierung der Signalkaskade benötigen (Bauer et al., 2001). Das optimale hTLR9 DNA-Motiv ist GTCGTT, während der mTLR9 am besten auf die Sequenz GACCGTT anspricht (Bauer et al., 2001). So reagieren hTLR9 transfizierte Zellen nur schwach auf murine CpG-Motive und umgekehrt, was darauf hinauszielt, dass TLR9 CpG-DNA direkt erkennen kann.

Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass für die Aktivierung durch CpG-DNA eine Rezeptor-vermittelte Endozytose und eine nachfolgende endosomale Prozessierung von entscheidender Bedeutung ist (Ahmad-Nejad et al., 2002; Hacker et

al., 1998). Der für das Einschleusen der DNA in die Zelle notwendige Rezeptor konnte bis dato jedoch noch nicht identifiziert werden.

TLR9 wird neben den schon erwähnten plasmazytoiden DCs, auch von humanen B-Zellen exprimiert (Bauer et al., 2001; Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001b; Krug et al., 2001b; Sparwasser et al., 1998; Sparwasser et al., 2000).

Die genauen zellulären und molekularen Mechanismen wie Plasmid DNA das unspezifische Immunsystem bzw. seine Zellen aktiviert müssen noch detailliert erkundet werden, da es strukturelle Unterschiede zwischen doppelsträngiger Plasmid DNA und synthetischen Einzelstrang-CpG-ODNs (siehe auch unter 3. Ergebnisse) gibt.

1.4 Die TLR-Signalkaskade

Ausgehend von Toll-like-Rezeptoren führt eine Signal-Kaskade zur Expression von Genen, die für die Immunantwort verantwortlich sind. Wie oben schon erwähnt findet sich sowohl bei den Toll-like- als auch bei den IL-1-Rezeptoren die sogenannte TIR-Domäne, so dass man von einem gemeinsamen Signalweg ausgehen kann, der über beide Rezeptor-Familien induziert werden kann.

Die gemeinsame Signalkaskade der IL-1-R- und TLR-Familien lässt sich in mehrere Schritte unterteilen. Die Bindung der jeweils spezifischen Liganden an einen Rezeptor führt zur Assoziation des Adaptor-Proteins MyD88 (Myeloid Differentiation Marker 88) (Burns et al., 1998; Medzhitov et al., 1998; Muzio et al., 1997; Wesche et al., 1997), das mit seiner carboxy-terminalen TIR-Domäne an die des Rezeptors bindet. Die amino-terminale Death-Domäne von MyD88 assoziiert mit der amino-terminalen Death-Domäne von IRAK (IL-1-R Associated Kinase) und bindet IRAK an den Rezeptorkomplex (Burns et al., 1998; Medzhitov et al., 1998; Muzio et al., 1997; Wesche et al., 1997).

Im nächsten Schritt wird IRAK autophosphoryliert und interagiert mit TRAF6, das zu den TRAF (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factors) Adaptor-Proteinen zählt (Cao et al., 1996). Durch eine Ubiquitierung kann nun TRAF6 TAK-1 (Tumor Growth Factor β Activated Kinase) aktivieren, so dass es über eine MAP (Mitogen Activated Protein) Kinase Stimulation zur JNK(c-Jun N-terminal Kinase) -Aktivierung und letztendlich zur NF κ B-Aktivierung kommt (Shirakabe et al., 1997). Ebenfalls von TRAF6 aus führt die Signalkaskade über NIK (NF κ B Inducing Kinase) und die I κ B (Inhibitor of κ B) Kinase zur Freisetzung von NF κ B (ursprünglich identifiziert als Nuclear factor, notwendig für die Transkription von der leichten Immunglobulin κ

Kette in B-Zellen), einem wichtigen Transkriptionsfaktor bei angeborenen und erworbenen Immunantworten (DiDonato et al., 1997).

Abbildung 2

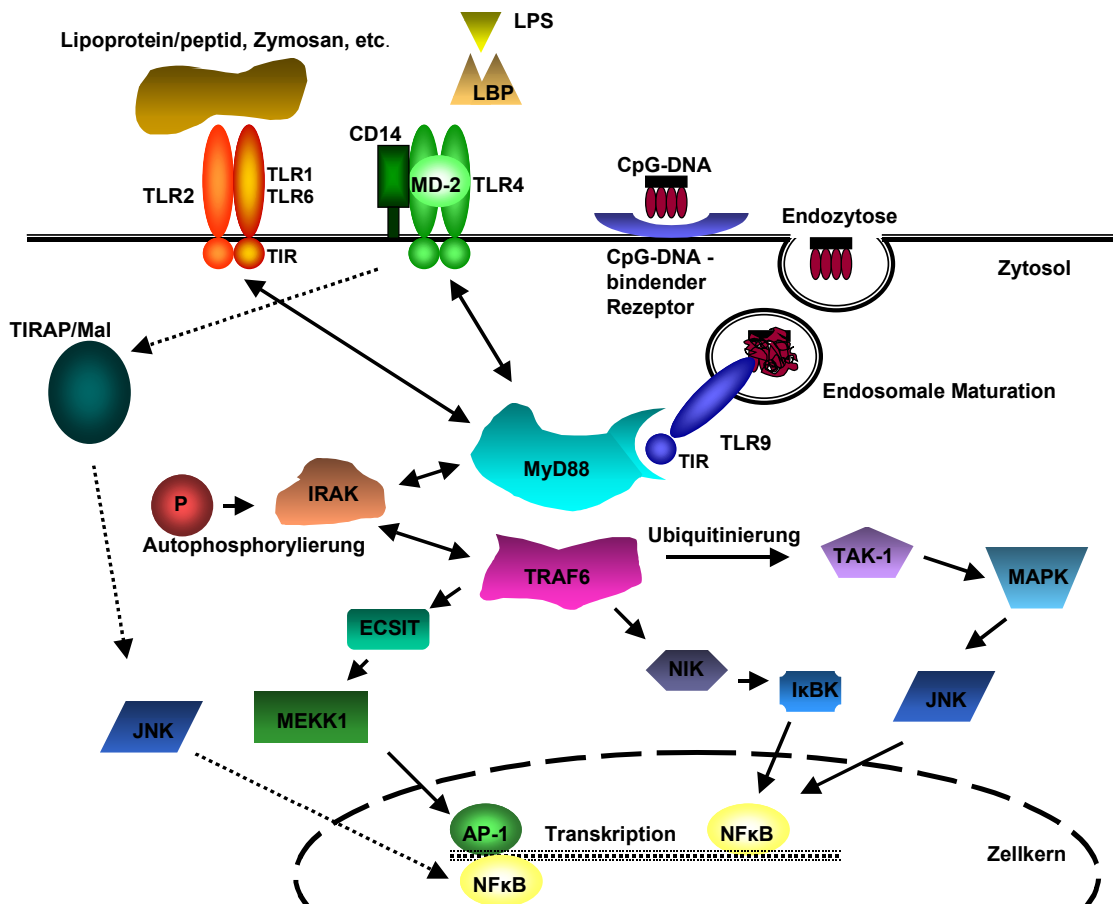


Abb.2: Signalkaskade der Toll-Like-Rezeptoren.

Abkürzungen siehe Text; → MyD88 unabhängiger Signalweg

Des Weiteren kann TRAF6 über ECSIT (Evolutionary Conserved Signaling Intermediate in Toll Pathways) und die MAP3-Kinase MEKK1 zusätzlich zu NFκB den Transkriptionsfaktor AP-1 (Activator Protein) freisetzen (Kopp et al., 1999).

In weiteren Untersuchungen zu den TLR-Signalketten konnte festgestellt werden, dass bei MyD88-gendefizienten Mäusen durch Peptidoglykan, Lipoproteine, CpG-DNA, dsRNA, Imidazoquinolin oder Flagellin keine Immunantworten hervorgerufen werden konnten (Alexopoulou et al., 2001; Hacker et al., 2000; Hayashi et al., 2001; Hemmi et al., 2002; Schnare et al., 2000; Takeuchi et al., 2000a; Takeuchi et al., 2000b). Diese Ergebnisse zeigen, dass MyD88 beim TLR-Signalweg eine Schlüsselposition einnimmt. Eine Ausnahme zu dieser MyD88-abhängigen Kaskade bildet die

Aktivierung von TLR4 durch LPS. LPS kann, wenn auch in geringerem Ausmaß, MyD-unabhängig NF κ B und JNK aktivieren (Kaisho et al., 2001; Kawai et al., 1999). Als Schlüsselprotein dieses Aktivierungsweges wurde TIRAP/Mal (TIR domain-containing Adaptor Protein/ MyD88-adaptor-like) identifiziert (Fitzgerald et al., 2001; Hornig et al., 2001).

Es existieren somit für LPS und TLR4 MyD88-abhängige und -unabhängige Signalketten, während die anderen Toll-like-Rezeptoren, wie auch der in dieser Arbeit näher beobachtete TLR9, von MyD88 abhängig zu sein scheinen (Hacker et al., 2000).

1.5 TLR9 und CpG-DNA

1.5.1 CpG und dendritische Zellen

Dendritische Zellen agieren als antigenpräsentierende Zellen (APCs) für die Induktion naiver T-Lymphozyten. Um Antigene (PAMPs) zu erkennen sind sie mit verschiedenen PRRs ausgestattet. Dazu zählen auch die Toll-like-Rezeptoren. Da es mehrere Subtypen humaner und muriner dendritischer Zellen gibt, finden sich auf diesen verschiedene TLR-Expressionsmuster. Diese erlauben den DCs verschiedene Immunreaktionen auf unterschiedliche PAMPs zu induzieren. So exprimieren zum Beispiel humane (h-CD11c⁻CD123⁺) plasmazytoide DCs vor allem TLR7 (Ito et al., 2002) und TLR9 (Bauer et al., 2001; Ito et al., 2002; Kadowaki et al., 2001a; Kadowaki et al., 2001b; Krug et al., 2001b), während myeloide DCs (MDDCs = monocyte derived DCs) überwiegend TLR2, 3 und 4 aber nicht 9 besitzen (Bauer et al., 2001; Hornung et al., 2002; Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001a; Kadowaki et al., 2001b; Krug et al., 2001b). Daher sprechen im humanen System nur myeloide DCs auf TLR2, 3 und 4 Liganden an, wohingegen neben B-Zellen nur plasmazytoide DCs auf CpG-DNA reagieren. Im murinen System aber exprimieren neben Makrophagen und B-Zellen sämtliche identifizierten DC-Subtypen TLR9 und sprechen so auf CpG-Sequenzen an (Hochrein et al., 2002). Dieser Unterschied ist bedeutsam, da Ergebnisse des Maus-Modells für Immunantworten auf CpG-DNA nicht direkt auf das humane System übertragen werden können.

Humane pDCs wie auch murine pDCs reagieren auf CpG-DNA Stimulation mit der Produktion von Typ I IFN (IFN α , β) und verschiedenen Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und IL-12 (Hochrein et al., 2002). Außerdem werden auf den initial unreifen DCs durch die Stimulation von Plasmid-DNA bzw. synthetischen ODNs die Oberflächenmarker MHC II, CD40, 80 und 86 hochreguliert (Asselin-Paturel et al., 2001).

1.5.2 CpG und Makrophagen

CpG-DNA kann auch murine Makrophagen und deren im Blut zirkulierende Vorläuferzellen, die Monozyten, auf direktem Weg aktivieren und über NF κ B (Stacey et al., 1996) Zytokin-Produktion induzieren. Zu den produzierten Zytokinen zählen unter anderem TNF- α (Sparwasser et al., 1998) und das IFN γ -stimulierende IL-12 (Cowdery et al., 1999). Über IFN γ , das von NKC's und T-Zellen produziert wird (siehe 1.5.4 und 1.5.5), induziert CpG-DNA die Expression der Stickoxid-Synthetase der Makrophagen und somit der NO-Produktion (Sweet et al., 1998), die für die Abtötung der Pathogene nötig ist.

Die durch TLR-Ligation verstärkte Präsentation des Antigens via MHC II erlaubt Makrophagen als APCs die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen zu vermitteln. Es wurde allerdings gezeigt, dass die anfänglich starke Antigenprozessierung und MHC-Präsentation als Reaktion auf CpG nach ungefähr 20 Stunden wieder nachlässt (Chu et al., 1999; Ramachandra et al., 1999).

Außerdem können Raw-Zellen (Makrophagen-Zell-Linie) und Milzzellen als Reaktion auf CpG verstärkt Cyclooxygenase-2 exprimieren und Prostaglandin E₂ sezernieren (Chen et al., 2001). PG E₂ kann durch eine Hemmung der IFN γ -Produktion gegenregulatorisch auf die T_H1- Immunantwort (siehe 1.5.4) wirken.

Wie unter 1.5.1 schon erwähnt können allerdings humane Monozyten keinen TLR9 exprimieren, weshalb diese Zellen nicht von CpG-DNA stimuliert werden können.

1.5.3 CpG und B-Zellen

Plasmid-DNA und synthetische ODNs können B-Zellen direkt stimulieren zu proliferieren und in den Zellzyklus einzutreten (Krieg et al., 1995). Innerhalb kürzester Zeit sezernieren die Immunzellen IL-6 und IL-10 (Redford et al., 1998; Yi et al., 1996b), wovon Ersteres den zur IgM-Produktion notwendigen Stimulus für die B-Zellen darstellt (Yi et al., 1996b). IL-10 wirkt gegenregulatorisch zur IL-12-Sekretion (Cowdery et al., 1996; Redford et al., 1998). Das von NKC's und T-Zellen durch Induktion von CpG-DNA sezernierte IFN γ verstärkt die IL-6 und IgM Produktion der B-Zellen (Yi et al., 1996a). Über die Zytokin- und Antikörper-Sekretion hinaus werden bei Aktivierung der B-Zellen ähnlich den DCs deren kostimulatorischen Oberflächenmoleküle MHC II, CD80 und CD86 sowie der Fc γ -Rezeptor vermehrt exprimiert (Davis et al., 1998; Kobayashi et al., 1999; Krieg et al., 1995).

1.5.4 CpG und T-Zellen

Bei Aktivierung durch CpG-DNA werden wie oben schon erwähnt auf zunächst unreifen dendritischen Zellen Oberflächenmoleküle wie MHC II, CD40, 80 und 86 verstärkt exprimiert und Typ I Interferone und Zytokine wie IL-12 vermehrt produziert. Durch die kostimulatorischen Moleküle, die sich auch auf anderen APCs finden, sowie die Typ I Interferone und IL-12 werden naive T-Zellen aktiviert. Bei IL-12 handelt es sich um ein Hauptzytokin der frühen unspezifischen Immunantwort und um wichtigen Induktor der Zell-vermittelten Immunität. Es induziert bei CD4⁺ T-Zellen die Differenzierung zu T_H1-Zellen (Chu et al., 1997; Roman et al., 1997) deren Hauptaufgabe die Produktion von IFN γ darstellt, die ihrerseits ebenfalls von IL-12 stimuliert wird (Trinchieri, 1995). IFN γ ist wie oben schon erwähnt für die Aktivierung von Makrophagen zuständig. IL-12 verstärkt darüber hinaus bei aktivierten CD8⁺-T-Zellen die zytolytische Aktivität.

Eine direkte Stimulation ruhender T-Zellen durch CpG-DNA (ohne zwischengeschaltete APCs) wurde bisher noch nicht beobachtet (Iho et al., 1999; Lipford et al., 1997; Sun et al., 1998b; Wagner, 1999). CpG-DNA dient somit via DC-Aktivierung als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr.

1.5.5 CpG und Natürliche Killer Zellen

Ebenso wie T-Zellen werden NKCs durch CpG-DNA via IL-12 zur IFN γ -Produktion angeregt. Auch die zytolytische Aktivität der Zellen wird dadurch verstärkt (Ballas et al., 1996; Shimada et al., 1986; Yamamoto et al., 1988; Yamamoto et al., 1994a; Yamamoto et al., 1994b).

1.5.6 CpG als Adjuvans bei Vakzinierung

CpG-DNA stellt ein stärkeres Adjuvans im Bezug auf die Induktion von B- (gemessen an spezifischem IgG2a) und T-Zell (gemessen an Proliferation und IFN γ -Produktion) Immunantworten als der bisherige Standard, das komplette Freund'sche Adjuvans (CFA) (Sun et al., 1998a), dar. Auch im Vergleich mit weiteren Adjuvantien waren CpG-ODNs die stärksten Induktoren von T_H1 gerichteten Immunantworten (Chu et al., 1997; Kim et al., 1999; Lipford et al., 1997; Roman et al., 1997). In Kombination mit anderen Adjuvantien verstärkt sich die Adjuvans-Aktivität, was vor allem bei schwachen Antigenen eine Rolle spielt (Davis, 2000; Kim et al., 2000).

CpG-DNA wirkt nicht nur bei parenteraler, sondern auch bei oraler, mucosaler (Horner et al., 1998; McCluskie and Davis, 1998), intramuskulärer (Fynan et al., 1993), subkutaner (Lipford et al., 2000b) oder intradermalen (Raz et al., 1994; Sato et

al., 1996) Applikation. Dabei entsteht jeweils eine lokale T_{H1} -gerichtete Immunantwort (Kobayashi et al., 1999; Raz et al., 1996). Eine Ausnahme bildet die sogenannte Gene-Gun Immunisierung, bei der kleine mit Plasmid-DNA benetzte Goldpartikel unter die Haut oder in den Muskel geschossen werden. Diese Darreichungsform führt zu einer langanhaltenden T_{H2} -Immunantwort (Schirmbeck and Reimann, 2001). Um die obengenannten starken T_{H1} -Effekte auf das Immunsystem beobachten zu können, müssen das Plasmid oder die ODNs an der gleichen Stelle wie das Antigen injiziert werden. Dies muss jedoch nicht gleichzeitig stattfinden. Man konnte sogar bei einem sogenannten Pre-Priming, der CpG-Gabe eine Woche oder länger vor der Ag-Verabreichung stärkere Immunreaktionen feststellen als bei gleichzeitiger Injektion (Lipford et al., 2000b). CpG-DNAs sind sogar in der Lage Infektionen, die normalerweise eine T_{H2} -Reaktion hervorrufen, zu einer T_{H1} -gewichteten Immunantwort zu verschieben. Eine gleichzeitige CpG-DNA-Gabe kann bei einer Leishmanien-Infektion von Balb/c Mäusen somit die übliche T_{H2} -Reaktion in eine T_{H1} -vermittelte Immunantwort umlagern und die Tiere vor dem letalen Ausgang der Infektion schützen (Zimmermann et al., 1998). Auch in einem Maus-Asthma-Modell konnte gezeigt werden, dass durch gleichzeitige oder spätere CpG-DNA Verabreichung die T_{H2} -Immunreaktion, mit Eosinophilie im Respirationstrakt und IgE Produktion unterdrückt werden kann (Kline et al., 1998; Sur et al., 1999). Des Weiteren konnten Tiere durch CpG-Gabe ein bis zwei Wochen vor einer normalerweise tödlichen Infektion mit *Listeria monocytogenes* oder *Francisella tularensis* geschützt werden (Elkins et al., 1999; Krieg et al., 1998). Eine postexpositionelle Gabe von CpG konnte in Versuchen die Entwicklung von Prionen-Erkrankung (Sethi et al., 2002) und retroviral induzierten Leukämien (Olbrich et al., 2002) verhindern. CpG-DNA bietet im Mausmodell auch Schutz vor Malaria (Gramzinski et al., 2001; Sedegah et al., 1994), Ebola-Virus, Antrax (Klinman et al., 1999b), Herpes simplex Virus (Harandi et al., 2003; Pyles et al., 2002) und dem Respiratory Syncytial Virus (Cho et al., 2000). Die Impf-Wirkung von Plasmid-DNA bzw. synthetischen ODNs findet sich nicht nur im murinen Versuchsaufbau, sondern konnte auch bei Hühnern, die vor einer lokalen *E.coli* Infektion subkutan CpG erhielten, beobachtet werden (Gomis et al., 2003). All diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass CpG-DNA das unspezifische Immunsystem aktiviert und den Organismus zumindest über einige Wochen vor verschiedensten Keimen schützen kann. Die beschriebenen Adjuvans-Effekte von CpG-DNA als Vakzin lässt sich auf die verschiedenen unter 1.5.1 bis 1.5.5 beschriebenen Mechanismen zurückführen.

Die Bildung von Konjugaten aus Allergenen und CpG-DNA stellt einen entscheidenden Fortschritt in der Entwicklung der Immuntherapie dar. Durch die kovalente Bindung von CpG-DNA als Adjuvans an ein Allergen (Protein) wird die Ag-Aufnahme durch DCs und die darauffolgende langanhaltende T_H1-Immunantwort auffallend verbessert ohne dabei die allergenen Wirkungen zu verstärken; die immunstimulierenden Eigenschaften von CpG-DNA bleiben zusätzlich erhalten (Cho et al., 2000; Shirota et al., 2001; Shirota et al., 2000; Tighe et al., 2000).

Diese Beobachtungen zu CpG-DNA als Vakzin-Adjuvans bei Mäusen führen zu der Frage, ob CpG bei Primaten ähnliche Effekte hervorruft. Erste positive Ergebnisse wurden bei Versuchen mit Affen (Jones et al., 1999) und Schimpansen (Hartmann et al., 2000) beschrieben. Auch normalerweise hyporesponsive Orangutans zeigten bei Kombination eines handelsüblichen Hepatitis B Impfstoffs mit CpG-DNA eine hundertprozentige Serokonversion und stark erhöhte Antikörpertiter (Davis et al., 2000). In klinischen Versuchen am Menschen konnten durch die Kombination von CpG-DNA mit einem Hepatitis B Impfstoff viel höhere Impferfolge erzielt werden (Krieg, 2002b).

Bei der sogenannten DNA-Vakzinierung handelt es sich um eine junge und wichtige Technik zur Induktion von Immunantworten auf ein Protein-Antigen. Die Immuneffekte basieren auf den in der DNA enthaltenen CpG-Motiven (Klinman et al., 1997; Tighe et al., 1998) und stellen sich wie oben beschrieben dar. Die meist verwendete Plasmid-DNA (daneben gibt es Versuche mit mRNA) enthält die Gensequenz des betreffenden Antigens, das von transfizierten Zellen exprimiert und präsentiert wird. Im Vergleich zu herkömmlichen Impfstoffen bietet die DNA-Immunisierung verschiedene Vorteile. So führt sie zum Beispiel zu einer starken humoralen Immunreaktion sowie einer effizienten CTL-Antwort. Ein weiterer Aspekt sind die geringeren Nebenwirkungen im Gegensatz zu attenuierten Lebend-Vakzinen. Vom technologischen Standpunkt aus ist es weiterhin möglich eine große Bandbreite an Antigenen abzudecken, während ökonomisch betrachtet die Herstellung und Lagerung einfacher und kostensparender ist als bei vielen konventionellen Impfpräparaten (Schirmbeck and Reimann, 2001).

1.6 Fragestellung

Die Immunisierung mit nackter DNA, die die Sequenz für ein bestimmtes Antigen enthält, ist derzeit das Objekt zahlreicher Untersuchungen. Diese Technik ist dahingehend besonders attraktiv, da hiermit sowohl zelluläre als auch humorale Immunantworten induziert werden können (Donnelly et al., 1997; Gurunathan et al.,

2000; Schirmbeck and Reimann, 2001). Die Stärke der Immunantwort ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig, wie zum Beispiel der Genexpression oder der Immunogenität des exprimierten Antigens. Wie zuvor schon ausführlich beschrieben sind die Immuneffekte von bakterieller Plasmid-DNA auf die in ihr enthaltenen CpG-Motive zurückzuführen (Krieg, 2002a; Wagner, 1999). Man geht davon aus, dass bei nackter DNA dessen immunostimulatorische Wirkung durch CpG-Motive im Antibiotika-Resistenz-Gen oder in nicht kodierenden Abschnitten vermittelt wird (Klinman et al., 1999a; Sato et al., 1996). Wie oben bereits ausführlich dargestellt, werden die Signale von CpG-DNA via Toll-like-Rezeptor 9 vermittelt. Bis dato ist jedoch unklar, ob auch die Effekte von nackter Plasmid-DNA TLR9-abhängig sind.

In dieser Arbeit soll nun unter Verwendung des Modell-Proteins Ovalbumin (OVA) bzw. dessen Peptids SIINFEKL der Frage nachgegangen werden, ob nackte Plasmid-DNA das murine Immunsystem über TLR9 aktiviert.

In ersten Vorexperimenten soll die Funktionsfähigkeit des Plasmids für die Peptidexpression sowie die Sekretion überprüft werden.

Zur Etablierung eines Protokolls und dem Nachweis einer funktionellen Relevanz der Immunisierung mit dem Plasmid-DNA-Modell sollen dann Wildtyp-Mäuse vakziniert werden und mögliche induzierte CTLs mittels CTL-Assay mit SIINFEKL-gepulsten EL-4 Zellen getestet werden. Positive Ergebnisse würden die Möglichkeit einer Vakzinierung mittels der Plasmid-DNA bestätigen und bei einer späteren Untersuchung von Knockout-Tieren hilfreich sein.

Anhand der Expression der Aktivierungsmarker sowie der Zytokinproduktion sollen die einzelnen Zellpopulationen (B-Zellen, DCs, Makrophagen) auf ihre Reagibilität auf Plasmid-DNA untersucht werden. Dabei soll der Frage nachgegangen werden, ob pDNA möglicherweise eine Zellpopulation spezifisch stimuliert oder synergistisch alle Populationen des Innate Immunsystems aktivieren kann.

In einem weiteren Schritt soll für die einzelnen Zellpopulationen unter Verwendung von TLR9-gendefizienten Mäusen (TLR9^{-/-}) untersucht werden, ob die Plasmidstimulation TLR9-vermittelt ist.

Hierzu soll die Proliferation von B-Zellen, die IFN α -, IL-6-Produktion und Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle von DCs, sowie die Lyseaktivität und quantitative Induktion SIINFEKL-spezifischer CTLs jeweils aus TLR9^{+/+}- und TLR9^{-/-}- Mäusen nach Plasmidstimulation bzw. Plasmidvakzinierung verglichen werden. Unterschiede zwischen wt- und ko-Zellen würden eine TLR9-Vermittlung beweisen, identische Ergebnisse Hinweise für einen weiteren bis dato unbekanntem Signalweg liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Weibliche C57BL/6 Mäuse wurden von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen.

Die C57BL/6 Toll-like-Rezeptor-9-gendefizienten (TLR9^{-/-}) Mäuse wurden freundlicherweise von Shizuo Akira, Osaka-University Japan, überlassen und am Institut gezüchtet und auf einen C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt.

Alle Tiere wurden unter speziellen pathogenfreien Bedingungen gehalten und im Alter von 8-12 Wochen verwendet.

2.2 Zellkulturen

- ANA: Murine Makrophagen-Zelllinie von C57BL/6 Mäusen. Erworben von American Type Culture Collection (Rockville, MD).
- EL-4: (H-2^b) Thymom-Zellen. Erworben von American Type Culture Collection (Rockville, MD).
- B3Z: Somatisches T-Zell-Hybridom. Entstanden durch die Fusion des OVA/K^b-spezifischen zytotoxischen Klon, B3, mit einem lacZ-induzierbaren Derivat eines BW5147 Fusionspartners. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. B.L. Kelsall (National Institutes of Health, Bethesda, MD) zur Verfügung gestellt.
- 293T: Humane, embryonale Nierenzellen. Erworben von American Type Culture Collection (Rockville, MD).
- J774: Murine Makrophagen-Zelllinie. Erworben von American Type Culture Collection (Rockville, MD).

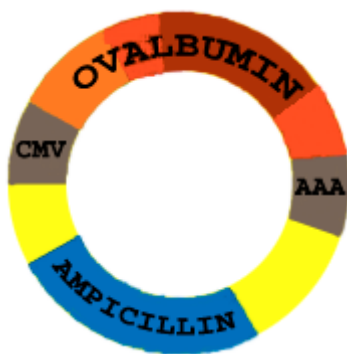
Die Zellen wurden in VLE RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Deutschland, FG 0435) Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Dabei wurden folgende Zusätze verwendet:

- | | |
|--|-----------------------|
| - FCS (Biochrom, S 0115) | 10%, hitzeinaktiviert |
| - 2-Mercaptoethanol (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland Cat.N° 31350-010) | 1µl/ml Medium |
| - Penicillin/Streptomycin (Biochrom, A 2213) | 10µl/ml Medium |

2.3 Plasmide

Die Plasmide wurden freundlicherweise überlassen von R.M. Vabulas.

- pC-OVA: Antibiotika-Resistenz: Ampicillin
 Backbone: pcDNA3
 Insert: pAc-neo-ova
- pFLAG-OVA: Antibiotika-Resistenz: Kanamycin
 Backbone: pCMV-Tag2C
 Insert: pC-OVA
- pcDNA3: leerer Plasmid Vektor Invitrogen



pC-OVA



pFLAG-OVA

2.4 Transformation

Bei der Transformation werden Bakterien dazu gebracht Plasmid in ihr Inneres aufzunehmen und dort wie ihr eigenes Erbgut zu replizieren.

2.4.1 Material/ Reagenzien Transformation

- KCM (5x): 2M KCl 2,5ml
 1M CaCl₂ 1,5ml
 1M MgCl₂ 2,5ml
 H₂O auf 10ml
- DH5α: Escherichia coli Stamm
- SOC-Medium: Invitrogen (Carlsbad, CA) 15544-034
- _EH₂O (Water for Embryotransfer): Sigma (München, Deutschland) W1503
- Glycerol: Sigma G6279

2.4.2 Protokoll Transformation

1. KCM-Ansatz: pro Transformation ein Eppendorf Cup

KCM (5x)	20µl
DNA=Plasmid (0,1µg)	1µl
_E H ₂ O	79µl

→ auf Eis stellen

2. Bakterien DH5α auftauen und sofort auf Eis stellen.
3. Mit gekühlten Pipettenspitzen je 100µl Bakterien/ Transformation dazugeben.
4. 20 min auf Eis stehen lassen.
5. 1 min Hitzeschock bei 42 °C.
6. 1-2 min auf Eis stellen.
7. Je 400µl SOC-Medium in Raumtemperatur dazugeben.
8. Für 45 min bei 37°C schütteln (bei 300 rpm).
9. Je 50µl auf Lb-Platte mit dem Antibiotikum, das der Antibiotika-Resistenz des Plasmids entspricht) ausplattieren.
10. Platten über Nacht bebrüten.
11. Am nächsten Morgen: eine Kolonie mit Pipettenspitze antupfen und in ca. 10ml flüssiges Lb-Medium + Antibiotikum [1µl/ml] überbringen, bis Spätnachmittag abgedeckt auf Schüttler im Brutschrank inkubieren.
12. Am Spätnachmittag: in Erlenmeyer-Kolben mit ca. 500ml Lb-Medium mit Antibiotikum überführen, über Nacht auf Schüttler inkubieren.
13. Am nächsten Morgen:
 - Zur Aufbewahrung: Herstellen von Glycerolstock: 700µl Bakterien-Suspension + 300µl 50%Glycerol /Vial in -80°C.
 - Plasmidaufreinigung nach 12. bzw. aus Glycerolstock gefrorene Bakterien auf Platte auftragen und weiter ab 10.

2.5 Plasmidaufreinigung

Mit Hilfe des Qiagen EndoFree™ Plasmid Mega Kits wird Plasmid aus einer Suspension von Bakterien, die zuvor mit dem Plasmid transformiert und hochgezüchtet wurden (siehe 2.4), aufgereinigt.

2.5.1 Material/ Reagenzien Plasmidaufreinigung

- EndoFree™ Plasmid Mega Kit: QIAGEN (Hilden, Deutschland)
Cat.N°: 12381

- Isopropanol: Apotheke Klinikum Rechts der Isar (München, Deutschland) 2-017
- lowtox PBS: (Phosphat gepufferte Salzlösung)
Sigma D8537
- Messgerät: TBI Molbiol (Berlin, Deutschland) Ultrospec 3000 pro (UV/ visible Spectrophotometer)

2.5.2 Protokoll Plasmidaufreinigung

Vorbereitung: Transformierte Bakterien hochziehen siehe Punkt 2.4.2 9.-12.

1. Bakterien zentrifugieren mit SLA1500-Zentrifuge, 6000rpm, 15 min, 4°C.
2. Überstand abschütten.
3. Pellet mit 50ml /Plasmid Puffer P1 + RNase resuspendieren.
4. 50ml Puffer P2 dazugeben, vorsichtig vermischen, 4-6x schütteln, bei RT 5min inkubieren.
5. 50ml gekühlten Puffer P3 dazugeben, gleich mischen (vorsichtig, 4-6x schütteln), sofort:
6. Lysat in Cartridge (auf autoklavierte 500ml Flasche geschraubt) füllen, 10 min bei RT inkubieren.
7. Mit Vakuum-Pumpe Flüssigkeit durch Cartridge laufen lassen, 50ml FWB-Puffer in Cartridge füllen, vorsichtig mit sterilem Spatel umrühren, nochmals mit Vakuum durch Filter pumpen.
Achtung: ab hier nur noch Plastikmaterial verwenden!
8. 12,5ml ER-Puffer zum gefilterten Lysat geben. 10x schütteln und 30 min auf Eis inkubieren.
9. Nach 25 min Qiagen-Tip 2500 Filter mit 35ml QBT equilibrieren.
10. Anschließend inkubiertes Lysat in Filter geben, durchlaufen lassen.
11. Filter mit insgesamt 200ml QC-Puffer waschen, alles von Schritt 9-11 in Becherglas laufen lassen.
12. DNA mit 35ml QN-Puffer in 100ml Fläschchen eluieren.
13. Eluierte DNA mit 24,5ml Isopropanol RT präzipitieren, vortexen und sofort bei 4000rpm, 45min, 4°C zentrifugieren, Überstand vorsichtig abgießen.
14. 4ml endotoxinfreies 70% Ethanol zu DNA Pellet, vorsichtig das Pellet in 2ml Eppendorf Cup überführen, 10min bei 14000rpm zentrifugieren.
15. Überstand abnehmen und Pellet in geöffnetem Cap unter Flow trocknen lassen bis Pellet glasig ist. In passendem Volumen lowtox PBS (→500µl/Plasmid) lösen. Über Nacht in Kühlschrank stellen.

16. Am nächsten Tag 1h bei 37°C schütteln = lösen. 5min bei 14000rpm zentrifugieren, Überstand in neues Eppendorf Cup überführen.
17. Messen der Reinheit der DNA bei 1:100 Verdünnung: 5µl DNA + 495µl H_2O in Eppendorf Cup vorbereiten, dann in Küvette füllen und gegen 495µl H_2O + 5µl lowtox PBS bei 260 und 280nm messen.
18. DNA auf 2µg/µl einstellen. Aufbewahrung bei -20°C.

2.6 Transfektion

In dieser Arbeit wird bei einer Transfektion Plasmid mittels Elektroporation in Zellen eingeschleust.

2.6.1 Material Transfektion

- Gene Pulser: Biorad (Krefeld, Deutschland)

2.6.2 Protokoll Transfektion

1. Zellen zählen und entsprechend gewünschter Menge für Transfektion in yellow-Cup überführen, zentrifugieren (5min, 1200rpm) und Überstand absaugen.
2. Zellpellet mit 400µl RPMI (25% FCS)/ Transfektion resuspendieren.
3. Plasmid in Eppendorf Cup vorlegen, je Cup 400µl Zell-RPMI-Mix zugeben, resuspendieren und in vorbereitete Küvetten überführen.
4. 4. Elektroporation: Capacitance Extender 960µF
Gene Pulser EXT
Gewünschte Volt einstellen.
5. Ca. 10 min warten, unter Umständen mit ca. 5ml Medium waschen.
6. Ausplattieren auf 6-well-Platten, Inkubation bei 37°C.
7. Weiterverwendung für Westernblot und Präsentationsassay.

2.7 Präsentations-Assay

Bei diesem Assay wird die Präsentation von SIINFEKL (Peptidsequenz 257-264 von Ovalbumin) auf der Oberfläche der mit Plasmid transfizierten ANA-Zellen (Makrophagen) untersucht. Gemessen wird die LacZ-Aktivität von B3Z-Zellen, einem SIINFEKL/ K^b -spezifischem T-Zell-Hybridom, das mit einem LacZ-Reporter, der unter der Kontrolle von IL-2 Gen-Promotor-Elementen steht, transfiziert wurde. Die transfizierten ANA-Zellen werden mit B3Z koinkubiert. Werden nun die B3Z-Zellen durch SIINFEKL aktiviert, färben sie sich blau und können am Mikroskop ausgezählt werden.

2.7.1 Material/ Reagenzien Präsentations-Assay

- Entwickler-Mixtur:	K ₃ Fe(CN) ₆ Potassium Ferrocyanid (Sigma, P-3667)	30µl
	K ₄ Fe(CN) ₆ Potassium Ferrocyanid (Sigma, P-3289)	30µl
	MgCl ₂ (Roth, A5371)	15µl
	10% Triton X-100 (Biorad, Cat. 161-0407)	30µl
	10xPBS (Sigma D8537)	300µl
	H ₂ O (autoklaviert)	2555µl
	X-Gal (5-Bromo-4Chloro-3Indolyl-β-D-Galactoside, Gibco, 15520-018)	150µl
- Glutaraldehyd 50%:	Sigma G 6403	
- lowtox PBS:	Sigma D8537	

2.7.2 Protokoll Präsentations-Assay

1. ANA-Zellen transfizieren (siehe Punkt 2.5), im Brutschrank (37°C) inkubieren.
2. Nach ca. 9h mit B3Z in gewünschter Verdünnung in 96-well-Platte (Rundboden, steril) ausspipetieren, über Nacht bei 37°C inkubieren.
3. Entwicklung: Zunächst auf Flachboden-Platte übertragen, bei 1200rpm 2 min zentrifugieren, Überstand abnehmen.
4. Mit 100µl 0,5% Glutaraldehyd/well fixieren, 10 min bei RT inkubieren.
5. Zentrifugieren, Überstand abnehmen, mit 200µl PBS waschen, zentrifugieren, Überstand abnehmen.
6. 100µl/well Entwickler-Mixtur dazugeben und weiter inkubieren.
7. Nach ca.4h: am Mikroskop blau gefärbte Zellen/ Gesichtsfeld auszählen.

2.8 Western Blot

Mit einer SDS (Sodium dodecyl Sulfate)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine zunächst nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine aus dem Gel auf eine immobilisierende Nitrozellulose-Membran transferiert („blotting“). Nun kann die Position eines Proteins durch spezifische Antikörper erkannt werden. Dabei sind die Antikörper mit Enzymen gekoppelt, die chemilumineszente Signale abgeben und auf einem Film entwickelt werden können.

2.8.1 Material/ Reagenzien Western Blot

- 4x UGB-Puffer (upper gel buffer = 4x lower TrisHCl pH 6,8):	Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland: Art. 5429.2) SDS10% (Sodium dodecyl Sulfate, Sigma L5750) → pH 6,8 mit HCl einstellen auf 1l H ₂ O Milipore (nicht mit NaOH arbeiten)	60g ≅ 0,5M 40ml ≅ 0,4%
- 4x LGB-Puffer (lower gel buffer = 4x lower Tris HCl pH 8,8):	Tris (Roth, Art. 5429.2) SDS10% (Sigma L5750) → pH 8,8 mit HCl einstellen auf 1l H ₂ O Milipore (nicht mit NaOH arbeiten)	152g ≅ 1,5M 40ml ≅ 0,4%
- Semidry-Transfer-Puffer:	Tris (Roth, Art. 5429.2) Glycine (Sigma, G-8898) SDS10% (Sigma L5750) Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.06009.2511) → auf 2l mit H ₂ O Milipore	11,64g 5,86g 7,5ml 400ml
- Trenngel (pH 8,8) (für ca. 10 Gele):	4x LGB Acrylamid 30% (Biorad #161-0158) H ₂ O (autoklaviert) APS 10-20% (Adenosin '5 Phosphosulfat, Sigma, A-5508) Temed (Pierce, Bonn, Deutschland #17919) Gel rasch gießen, 400µl Butanol (Sigma, BT-105) auf jedes Gel geben, damit Gel eben wird. 1-2h bei RT fest werden lassen, Butanol unter fließendem H ₂ O abwaschen und Gele in 1xLaufpuffer kühl lagern.	25ml 25ml 50ml 400µl 70µl
- Sammelgel (pH 6,8) (für 2 Gele):	4xUGB RT (s.oben) Acrylamid 30% (Biorad # 161-0158) H ₂ O (autoklaviert) APS10% (Sigma, A-5508) Temed RT (Pierce, #17919)	3,75ml 2,4ml 13,8ml 70µl 30µl

- Kammer mit Stabpipette ohne Luftblasen zwischen Glas und Plastikwand füllen.
- 5xLaufpuffer: Tris (Roth, Art. 5429.2) 151g
 Glycine (Sigma, G-8898) 940g
 SDS 0,5% 50g \cong 50ml
 SDS10% (Sigma, L5750)
 → auf 10l mit H₂O Milipore auffüllen, pH nicht einstellen, sollte wenn man Puffer 1x verdünnt pH 8,3 sein
- 10xTBS : Tris (Roth, Art. 5429.2) 0,2M 24,2g
 NaCl (Roth, Art. 3957.2) 1,37M 80g
 → pH 7,6 mit HCl einstellen, mit H₂O Milipore auf 1l
- TBST: 1xTBS (\cong 1l 10xTBS + 9l H₂O Milipore) + 10ml Tween 20 (Poly Oxyethylenesorbitan Monolaurate, Sigma, P-5927)
- Skim Milk Powder: Fluka Biochemika (München, Deutschland) #70166
- 1x Lämmli Puffer: Tris Hydrochlorid (Roth, Art. 9090.3) pH6,8 6,25ml
 SDS (Sigma L5750) 2g
 Glycerol (Sigma G6279) 50g
 EDTA (Sigma 6758) 58,44mg
 Bromphenolblau (Sigma, B5525) 100mg
 → H₂O auf 100ml
- Lämmli Puffer für Zellyse: 4x Lämmli + 10% DTT (1,4 Dithiothreitol, Roche Diagnostik, Mannheim, Deutschland, 708984)
- Zellyse-Puffer = ERK-Lyse-Puffer (für 12well-Platte): HEPES pH7,5
 (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethansulfonic acid, Fluka Biochemika 54457) 25mM
 NaCl (Roth, Art. 3957.2) 150mM
 EDTA (Sigma E6758) 1mM
 EGTA (Sigma E4378) 1mM
 Glycerol (Sigma G6279) 10%

	TritonX-100 (Biorad, Cat. 161-0407)	1%	
			3ml
	Leupeptin (Roche Diagnostik, 1017101)		20µl
	Aprotinin (Roche Diagnostik, 236624)		40µl
	PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid, Sigma, P7626)		4µl
- Trichloressigsäure 50%:	(TCA 50%) Roth, Art. 8789.1		
- Gel Blotting Papier:	Schleicher&Schnell (Dassel, Deutschland) #10426994		
- Protron Nitrocellulose Transfer Membran 0,45µm:	Schleicher&Schnell #10401196		
- Geräte:	Gelkammer: Hoefer SE 250 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA) Trans Blot SD Semidry Transfer Cell (Biorad)		
- Entwickler:	Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA) Western Lightning enhanced humid reagent: 1:1 Western lightning NEL 101 Oxidating reagent NEL 102		
- Entwickler-Kammer:	Kodak [®] x-omatic cassette		
- Film: Hyperfilm [™] ECL [™]	amersham pharmacia biotech (Freiburg, Deutschland) RPN 3103K		

2.8.2 Antikörper für Western Blot

- Erstantikörper:	anti OVA	Sigma A 6075	1:5000
Zweitantikörper:	Goat anti Mouse	Sigma A9917	1:10000
- Erstantikörper:	anti Flag M2	Sigma F3165	1:4000
Zweitantikörper:	Goat anti Mouse	Sigma A9917	1:10000
- ERK-Lyse-Kontrolle:			
Erstantikörper:	Anti MAP Kinase/ ERK 1/ 2-CT	Upstate Cell Signaling Solutions # 06-182 (vertrieben über Biomol, Hamburg, Deutschland) Upstate Cell	1:2000
Zweitantikörper:	Anti Rabbit IgG (HRP Conjugate)	Signaling Solutions # 12-348	1: 5000

2.8.3 Zellyse für Western Blot

- Lyse der transfizierten Zellen:

1. Eppendorf Cups beschriften und auf Eis stellen.
2. Medium von 6-well-Platte mit transfizierten Zellen absaugen, Platten auf Eis stellen.
3. Mit Multistepper 200µl/well Lyse-Puffer, 10min auf Eis inkubieren, dann 2-3mal an Tischkante klopfen.
4. Je Probe 180µl in Eppendorf Cup überführen, dann einzeln weiterbehandeln:
5. 60µl 4xLämmli-Puffer+DTT10% dazugeben, schnippen und 5min bei 95°C inkubieren.
6. 3mal mit Ultraschall behandeln.
7. Eppendorf Cups 10min bei 14 000rpm zentrifugieren, dann bei -80°C einfrieren oder auf Western-Blot-Gel auftragen (nach Auftauen wieder 5min bei 95°C erhitzen und zentrifugieren).

- Lyse des Überstands von transfizierten Zellen:

1. 500µl Überstand von 6-well-Platte mit transfizierten Zellen abnehmen und 5min bei 13 000 rpm zentrifugieren.
2. 400µl Zweitüberstand in beschriftete Eppendorf Cups, 100µl 50% TCA (TriChlor Essigsäure → 10% Endkonzentration der TCA), 30min auf Eis inkubieren.
3. Zentrifugieren bei 4°C, 5min, 14 000rpm, Überstand mit Pipette abnehmen und noch mal zentrifugieren.
4. 100µl 4xLämmli + 10%DTT hinzugeben, Lysat wird gelb
5. Länger mit Ultraschall behandeln als bei normaler Zellyse.
6. Eventuell mit NaOH neutralisieren bis Lysat wieder blau.
7. wie Schritt 7. bei normaler Zellyse

2.8.4 Protokoll Western Blot

1. Trenngel (siehe unter 2.8.1) senkrecht in Kammer stellen, mit 2 roten Klammern Gelplatte mit Plastikrahmen verbinden.
2. Sammelgel herstellen (siehe unter 2.8.1).
Kamm seitlich beginnend in Sammelgel schieben bis er am Rahmen aufliegt, ist nach ca. 30 min fest.
3. Standard (See BlueTM Plus 2, Novex #LC5925) und Proben (wenn tiefgefroren, sonst schon bei Lyse unter 2.8.3) 5min bei 95°C erhitzen und anschließend zentrifugieren.

4. Kammern, Raum zwischen Gel und Plastikrahmen und Reservoir bis zum Plateau mit Laufpuffer füllen.
5. 5µl Standard ganz links, Proben in nachfolgende Kammern.
6. Laufkammer schließen und an Stromkreis anschließen: 180V, 50mA pro Gel, Laufzeit ~ 50min.
Währenddessen Gel-Blotting-Papier (4 Stück pro Gel), Nitrocellulose-Membran zurechtschneiden.
7. Semidry-Methode:
Laufrichtung der Proteine vom Deckel (negativer Pol) zum Boden (positiver Pol). Blotting-Papier und Membran in Semidry-Transfer-Puffer einweichen, währenddessen:
8. Gel stoppen, vorsichtig Glasplatte von Plastikplatte trennen, Gel in Größe von Membran bringen (oben Kammern und unten unbenutzter Abschnitt entfernen)
9. Membran auf zwei Blotting-Papieren auf Biorad Trans Blot SD Semidry Transfer Cell legen, gut mit Semidry-Transfer-Puffer befeuchten, Gel vorsichtig auf Membran legen, mit zwei weiteren eingeweichten Papieren abdecken. Luftblasen vermeiden und immer alles gut mit Puffer anfeuchten.
10. Gerät einschalten: 2mA/cm² Gel, 25 V, Transfer-Zeit 30min- 1h.
11. Vorsichtig Gerät öffnen, Standard-Banden sollten auf der Membran sichtbar sein.
Mit Kugelschreiber Membranen numerieren und Standard-Banden nachzeichnen.
12. Blocken der Membran für 1-2h in 5% milk-powder in TBST
13. Milchlösung abschütten, mit 1xTBS waschen und wieder TBS auf Membran geben.
14. Erst-Antikörper in entsprechendem Verhältnis in 5%milk-TBST verdünnen, TBS wegschütten, Ak-Verdünnung auf Membran geben (Membran darf nicht austrocknen! optimal 6ml/Membran), über Nacht im Kühlraum schwenken.
15. Am nächsten Tag Ak-Lösung verwerfen, 3x mit TBST waschen (immer 5-10min schwenken).
16. Sekundär-Antikörper in entsprechender Verdünnung in 5%milk-TBST, 10ml/Membran, 1-2h bei RT schwenken, danach wieder 3x mit TBST und 1x mit TBS waschen.
17. Entwickler 1:1 5ml/ Membran, 1min schwenken. Membran in Entwickler-Kammer zwischen 2 Folien und in Dunkelkammer entwickeln.

2.8.5 Strippen eines Western Blots

Dabei wird die Membran nach Erstentwicklung vom Antikörper befreit und ein neuer Antikörper gebunden.

Material:

Pierce Strip Lösung: RestoreTM Western Blot Stripping Buffer # 21059

1. Membran kurz mit H₂O Milipore waschen, je Membran 10ml Pierce Strip Lösung RT auf Membran, 20 min bei RT schwenken lassen. Noch einmal kurz mit MiliporeH₂O waschen.
2. Blockieren mit 5% milk in TBST, 1h bei RT schwenken.
3. 1x mit 1xTBS waschen, noch einmal TBS.
4. Wie 2.7.3 ab Schritt 16

2.9 Immunisierung

2.9.1 Material/ Reagenzien Immunisierung

- Plasmid: siehe unter 2.3
- Ovalbumin (OVA): Sigma A2512
- 1668: Phosphotioat-modifiziertes Oligonucleotid mit folgender Sequenz: 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3', TIB Molbiol, Berlin Deutschland
- Inkomplettes Freund'sches Adjuvans Sigma F-5506, IFA: 300µg OVA = 1:1 (IFA):
- Spritzen: 1ml SubQ, Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) #305501

2.9.2 Immunisierungsprotokoll

Zur Etablierung der Immunisierung wurden zunächst nur Wildtyp-Mäuse (C57/Bl6) verwendet. Injiziert wurden Gruppen von je zwei Tieren. Jede Maus erhielt 200µg Plasmid in 100µl lowtox PBS. Die Kontrolltiere wurden mit ebenfalls 100µl Injektionsgemisch aus 3mg/ml Ovalbumin und 1nmol/µl 1668 gespritzt. Es wurden folgende Injektionsmodi untersucht: intramuskuläre Injektion in den Musculus quadrizeps femoris und subkutane Injektion in die Schwanzbasis. Außerdem wurde die Anzahl der Restimulierungs-Injektionen nach dem Priming von keiner bis zweien variiert.

2.10 Organgewinnung und in vitro Restimulation

2.10.1 Material/ Reagenzien Organgewinnung und in vitro Restimulation

- Einmalsieb (100µm): Falcon[®]: Becton Dickinson #352360
 - ACK-Puffer: zur
Erythrozyten-Lyse

NH ₄ Cl (Sigma A4514)	0,15M	8,29g
KHCO ₃ (Aldrich 361038)	10,0mM	1g
Na ₂ EDTA (Aldrich 106313)	0,1mM	37,2g

→ 800ml H₂O hinzufügen und mit 1N HCl pH zw. 7,2 und 7,4 justieren, danach mit H₂O auf 1l auffüllen.
→ Durch 0,2µm Filter steril filtrieren, bei Raumtemperatur aufbewahren.
- SIINFEKL: Peptidsequenz 257-264 von Ovalbumin: Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu, Research Genetics Inc, Huntsville, AL
 - rekombinantes IL-2 (human) freundlichlicherweise zur Verfügung gestellt von Eurocetus (Amsterdam, Niederlande).

2.10.2 Protokoll Organgewinnung und in vitro Restimulation

Die Versuchstiere wurden zu entsprechenden Zeitpunkten nach Plasmid-Injektion mittels CO₂ getötet. Unmittelbar darauf wurde jedem Tier die Milz entnommen und bis zur weiteren Aufbereitung in RPMI-Medium ohne FCS aufbewahrt.

Zur in vitro Stimulation wurde im Folgenden jede Responder-Milz einzeln, steril verarbeitet.

1. Naive Mäuse (Stimulatoren):

- Isolierte Milz mit sterilem Spritzen-Stempel und RPMI 0% zur mechanischen Zerkleinerung über ausgekochte metallische Netze und anschließend zum Filtern von groben Organbestandteilen über Plastik-Einmalsieb schicken.
- Erythrozyten mit 5ml ACK-Puffer pro Milz 5min lysieren, dann mit 5ml RPMI 10% (37°C) Lysereaktion stoppen.
- Suspension 5min bei 1200upm zentrifugieren, absaugen, Zellen zählen.
- Auf 5Mio/ml einstellen und mit 0,5µM SIINFEKL 1,5h inkubieren.
- Anschließend 2x mit je 50ml RPMI 10% waschen.
- Irradiieren der Stimulator-Zellen: 884 sec, 3000rad.
- Zellen mit RPMI 10% auf 2Mio/ml einstellen.

2. Immunisierte Mäuse (Responder):

- Isolierte Milz wie oben behandeln.
- Nach Erythrozyten-Lyse mit RPMI 10% auf 5Mio/ml einstellen.

3. Zellen auf 24-well-Platte (2ml/well) aussähen:

- Je 2Mio geladene Stimulatoren.
- Je 5Mio Responder.
- Je 10U/ml rIL-2.
- 7d in isoliertem (nur T-Zellen) Brutschrank inkubieren. Anschließend CTL-Assay.

2.11 CTL-Assay

Zum Priming von zytotoxischen T-Lymphozyten siehe 2.9 Immunisierung. In vitro Restimulation der geprimten T-Zellen siehe 2.10 Organgewinnung und in vitro Restimulation.

EL4-Zellen werden mit radioaktivem Chrom (^{51}Cr) beladen, wovon die Hälfte der Zellen anschließend mit SIINFEKL inkubiert wird. Nach mehreren Waschvorgängen werden die EL4-Targetzellen zusammen mit den Effektor-T-Lymphozyten inkubiert. Die mit Peptid beladenen Targetzellen werden von den Immunzellen, die bereits zuvor in vivo SIINFEKL gesehen haben, erkannt und lysiert. Dabei wird das ^{51}Cr freigesetzt dessen γ -Strahlung anschließend im Überstand gemessen wird. Je effektiver die Lyse ist, desto höher ist auch die Menge des freigesetzten Chroms.

2.11.1 Material/ Reagenzien CTL-Assay

- Chromium-51: amersham pharmacia biotech (Freiburg, Deutschland), CJS4, 185MBq, Lot 0138

2.11.2 Protokoll CTL-Assay

1. EL-4-Zellen (Targetzellen)

- zählen u. einstellen auf 2Mio/100 μl RPMI 10%.
- 100 μl ^{51}Cr (100 μl =18,5MBq) zu EL-4 Lösung geben.
- 1,5h im Brutschrank inkubieren.

2. Zytotoxische T-Zellen vorbereiten:

- Siehe zunächst unter 2.10.
- Nach einer Woche Inkubation aus allen wells gleich immunisierte Zellen zusammenpipettieren.
- 5min bei 1200upm zentrifugieren, absaugen, resuspendieren und zählen.
- Mit RPMI 10% auf 1Mio/ml einstellen
- Auf 96-well-Platten (Spitzboden) 100 μl /well nach Schema ausplattieren

3. Target-Zellen mit Peptid pulsen:

- 5min bei 1200upm zentrifugieren, 1x waschen.
- Mit 1ml RPMI 10% resuspendieren, somit befinden sich in 0,5ml 1Mio Target-Zellen. Aufteilen auf zwei Gruppen:
 - a.) ohne Peptid: 0,5ml RPMI 10% + 0,5ml Targetsuspension
 - b.) mit Peptid: 0,5ml RPMI 10% mit 100nM SIINFEKL + 0,5ml Targetsuspension.
- 30 min im Brutschrank inkubieren. Anschließend mindestens 2x mit je 10ml RPMI 10% waschen.

4. CTLs und Target-Zellen zusammenführen:

- Je Target mit 1ml Medium resuspendieren, so dass 1MioTarget-Zellen/ml = 1000Zellen/ μ l.
- Targetsuspension so verdünnen dass 1000Zellen/100 μ l
- Je 100 μ l Target-Suspension/well mit 12 Kanal-Pipette auf vorbereitete 96-well-Platten.
- 4-6h bei 37°C inkubieren.

5. Mit 12 Kanal-Pipette vorsichtig je 100 μ l Überstand der inkubierten Zellen in Counter-Röhrchen übertragen (Maximallyse erst 5-10x resuspendieren)

6. γ -Counter einsortieren. Messung der radioaktiven Aktivität.

7. Auswertung:

Die spezifische Lyse wird nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{spezifische Lyse} = [\text{cpm}(\text{Probe}) - \text{cpm}(\text{Spontanlyse}) / \text{cpm}(\text{Maximallyse}) - \text{cpm}(\text{Spontanlyse})] \times 100$$

cpm = counts per minute

Die Spontanlyse variierte zwischen 5 und 12%.

2.12 Generierung von B-Zellen aus der Milz

2.12.1 Material/ Reagenzien Generierung von B-Zellen

- MACS (Magnetic Cell Sorting of Mouse Leukocytes): Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
- CD43 (Ly-48) mouse MicroBeads: Lot: 5020715005, Mat N°: 120-000-302, Ord: 130-049-801, zur Isolierung von unberührten B-Zellen
- Separation Columns: charge 5011122067, Mat N°: 120-000-475
- Ammoniumchlorid (NH₄Cl): Sigma A4514
- lowtox PBS: Sigma D8537
- RPMI komplett: siehe unter 2.2

2.12.2 Protokoll B-Zell Generierung

1. Milz steril entnehmen, in 50ml Tube mit Medium geben und auf Eis stellen.
Im weiteren Verlauf unter Sterilbank arbeiten!
2. Milz auf vorbereitetes, ausgekochtes Metallnetz, das über Zellschale mit 5ml lowtox PBS (immer 4°C) liegt, geben.
3. Milz mit sterilem Spritzenstempel zerreiben und Metall-Sieb mit 10ml PBS spülen.
Zell-PBS-Gemisch mit Pipette resuspendieren.
4. Suspension über 100µm Einmalsieb in 50ml Tube schicken und mit 5ml PBS spülen.
5. Resuspendieren und 1:4 Zählen, sollten ca. 100 Mio Zellen sein. Die restlichen Zellen bei 1500rpm 5min zentrifugieren.
6. Überstand abschütten und Pellet mit 1ml PBS anspülen, dann 2ml Ammoniumchlorid zur Erythrozytenlyse auf das Pellet geben. Glas-Pasteur-Pipetten verwenden. 2 min auf Eis inkubieren.
7. Nach 2 min mit loxtox PBS auf 30ml auffüllen, zentrifugieren (1500rpm, 5min), abschütten und nochmals mit 20ml PBS waschen.
8. BEAD-Inkubation: Pellet mit 200µl PBS anspülen, Zellen vorsichtig resuspendieren, dann 200µl CD43-Beads dazugeben und gut resuspendieren. Für genau 30 min auf Eis inkubieren; ab und zu sanft schütteln, damit sich Zellen und Beads besser vermengen.
9. Nach 30min mit 20ml PBS auffüllen, vorsichtig resuspendieren und bei 1500rpm 5min zentrifugieren.
10. Überstand abschütten und Zellen mit 1ml PBS anspülen und mit Glas-Pasteur-Pipette resuspendieren bis die Suspension homogen ist. Weitere 4ml PBS dazugeben.
11. Suspension auf die mit 5ml PBS equilibrierten Macs-Säulen geben und ganz durchlaufen lassen. Noch einmal 5ml PBS über die Säule schicken.
→ Durchgelaufene CD43-negativen Zellen sind die gewollten B-Zellen.
12. Zellen sind jetzt in 10ml. Resuspendieren und Zählen (1:4). Währenddessen Zellfraktionen 5min bei 1500rpm zentrifugieren.
13. Überstand Abschütten und 1ml RPMI komplett (RT) dazugeben, mit Glas-Pasteur-Pipette resuspendieren bis homogen und weitere 9ml RPMI komplett hinzufügen, resuspendieren und auf Eis aufbewahren.
14. Je Zellzahl entsprechende ml entnehmen und in die vorbereitete 12-well-Platte pipettieren. Ziel: 3Mio/ml/well und Probe.
15. 30min im Brutschrank inkubieren, anschließend stimulieren.

2.13 Generierung von dendritischen Zellen (DCs) aus dem Knochenmark

2.13.1 Material/ Reagenzien Generierung von DCs

- RPMI komplett: siehe unter 2.2
- Spritze: 10ml syringe, Becton Dickinson 02D10, Kanüle 27G
- GM-CSF:
 - Zellen auftauen (5Mio/ml) und in große Petrischale in G418-m-GM-CSF-Medium (RPMI komplett + 500µl G418/50ml) aufnehmen.
- Zelllinie
 - Je nach Zelldichte splitten.
 - nach 1-2 Wochen, Zellen waschen und in Medium ohne G418 entweder in großen Flasks aufnehmen (100ml, ca. 2 Mio/ml), oder in Flaschen für Rotatoren (2×11 à $0,6 \times 10^6$ /ml Aussaat, für 2d bzw. bis $2,5 \times 10^6$ /ml).
 - Bei Bedarf splitten (nur bei Flasks).
 - Wenn eine Dichte von 2,5 Mio/ml erreicht ist oder das Medium gelb wird, Zellen abzentrifugieren und den Überstand in 50ml Falcons überführen (nicht ganz voll machen, da sich die Flüssigkeit bei -20°C ausdehnt). Bei -20°C lagern.
 - Einsatz: 1:10 in Medium.
- G418 (Geneticin sulphate) Gibco, Best.Nr.: 11811-064
 - Stock-Konzentration auf 100mg/ml in Aqua injectabile oder Medium auflösen.
 - Mit NaOH auf pH 7,4 einstellen (bei Medium bis die Farbe stimmt).
 - Steril filtrieren über $0,2\mu\text{m}$ Filter.
 - Aliquots à 500µl (Einsatz für 50ml Medium).
Endkonzentration: 1mg/ml. Cave: lichtempfindlich!!

2.13.2 Protokoll Generierung von DCs

- Tag 0:
 1. Femur und Tibia mit sterilem Besteck präparieren, kurz in Petrischale mit Ethanol geben, dann in Schale mit Medium.
 2. Epiphysen abschneiden. Mit 10ml Spritze (27G-Kanüle) jeden einzelnen Knochen von jeder Seite mit 5ml Medium durchspülen, Knochenmark in 50ml Tube sammeln.
 3. Zellsuspension zentrifugieren (1200rpm, 5min) und in 10ml Medium

resuspendieren.

4. Zählen.

5. 5×10^6 pro Petrischale in 10ml Mediumgemisch (9,45ml RPMI komplett + 550 μ l GM-CSF)

- Tag 3: 10ml Mediumgemisch (9,45ml RPMI komplett + 550 μ l GM-CSF) zugeben.
- Tag 5: Zellen vorsichtig abnehmen, zählen und auf 3Mio/ml einstellen. Auf 12-well-Platte ausplattieren und anschließend stimulieren.

2.14 Stimulation und Durchfluss-Zytometrie (FACS = Fluorescence-Activated Cell Sorting) von B-Zellen und DCs

2.14.1 Stimulation

Nach Generierung der Zellen, zunächst aus C57BL/6 und MYD88^{-/-} Mäusen wie unter 2.12. und 2.13 beschrieben wurden die B-Lymphozyten am gleichen Tag und die DCs nach fünf Tagen in Kultur stimuliert.

Stimuliert wurde mit folgenden Substanzen:

- pC-OVA: siehe unter 2.3, in unterschiedlichen Mengen von 1-500 μ g
- 1668 CpG: Positiv-Kontrolle, siehe unter 2.9.1, 5 μ M
- LPS: Positiv-Kontrolle, Sigma, Serotyp 055:B5 E.coli, L-4524, 1 μ g/ μ l
- Cellfectin[®] Reagent: Invitrogen CatN^o: 10362-010 1mg/ml in unterschiedlichen Mengen

Nach der Stimulation wurden die Zellen weitere 24h bei 37°C inkubiert und anschließend mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenmoleküle der stimulierten Zellen gefärbt. Anschließend kann das Zytometer die Fluoreszenz auf einzelnen Zellen in der Suspension detektieren und somit die Anzahl der Zellen, die bestimmte Moleküle exprimieren feststellen.

2.14.2 Material/ Reagenzien FACS-Färbung

- FACS-Puffer: PBS (Sigma D8537) mit 3% FCS (Biochrom, S 0115)
- Fc-Block: Purified anti-mouse CD16/CD32 (Fc γ III/II Receptor) (2,4G2) 0,5mg/ml, PharMingen (Hamburg, Deutschland), Mat.No. 553142, Batch 0000027687, eingesetzte Verdünnung 1:10
- Antikörper: alle von PharMingen, eingesetzte Verdünnung 1:100

- CD40-FITC: FITC anti-mouse CD40 (3/23), Cat.: 09664D, Lot: M041988, 0,5mg/ml
 - Isotyp CD40-FITC: FITC hamster IgM λ isotype standard (anti TNP), Cat.: 553960, Lot: M060710, 0,5mg/ml (G235-1)
 - CD86-FITC: FITC anti-mouse CD86 (B7.2), Cat.: 553691, Lot: M067324, 0,5mg/ml
 - Isotyp CD86-FITC: FITC rat IgG_{2A} κ isotype standard (R35-95), Cat.: 553929, Lot: M055610, 0,5mg/ml
 - CD19-PE: PE anti mouse CD19 (ID3), Cat.: 553786, Lot: M069997, 0,2mg/ml
 - Isotyp CD19-PE: PE rat IgG_{2A} κ isotype standard (R35-95), Cat.: 11025A, Lot: M040271, 0,2mg/ml
 - CD11c-APC: APC anti mouse CD11c, Integrin α_x chain (HL3), Cat.: 550261, Batch: 0000037466, 0,2mg/ml
 - Isotyp CD11c-APC: APC hamster IgG, group 1, κ isotype control (anti TNP), Cat.: 553974, Lot: M067324, 2mg/ml
- Paraformaldehyd 2% (PFA 2%): Merck, 1.04003.1000
 - FACSCalibur flow cytometer, Beckton Dickinson
 - CellQuest Software

2.14.3 Protokoll FACS-Färbung

1. Stimulierte Zellen in Eppendorf Cup überführen. Bei 3500 rpm, 4°C, 2min zentrifugieren.
2. Überstände abnehmen und für Zytokin Bestimmung durch ELISA aufbewahren (tieffrieren).
3. Pellet mit 500 μ l Puffer vorsichtig resuspendieren und nochmals zentrifugieren. Überstand abnehmen und verwerfen.
4. Je Pellet 10 μ l Fc-Block (1:10 mit Puffer verdünnt) dazugeben, resuspendieren und 10min auf Eis inkubieren.
5. Währenddessen Ak-Verdünnungen herstellen und bei 4°C dunkel aufbewahren.

6. Nach Fc-Block Proben mit 200µl Puffer resuspendieren und auf Spitzbodenplatte auf zwei Färbeserien (CD40-FITC und CD86-FITC) verteilen (je 100µ pro well), unstimulierte Zellen entsprechend der Zahl der Einzelfärbungen mit Puffer resuspendieren und ebenfalls 100µl/well ausplattieren.
7. Platte bei 1200 rpm, 4°C, 2min zentrifugieren, Flick off des Überstandes.
8. Je well 30µl der entsprechenden Ak-Verdünnung daraufgeben und 30min im Kühlschrank (4°C und dunkel) inkubieren.
9. Nach Inkubation mit 100µl Puffer waschen (1200rpm, 4°C, 2min), Flick off des Überstandes.
10. Mit jeweils 200µl Paraformaldehyd (PFA) 2% fixieren und in FACS-Röhrchen überführen.
11. Mit FACSCalibur und CellQuest Software messen und auswerten.

2.15 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Bei diesem Assay handelt es sich um eine immunologische Methode zur Quantifizierung einer Antigen- bzw. Antikörper-Konzentration (hier Zytokine). Bei der hier verwendeten ‚Sandwich‘-Version wird zunächst eine Mikrotiter-Platte mit dem sogenannten Capture-Ak gecoatet. Nach einem Waschschrift werden die Proben mit der unbekanntem Menge an Antigen und die Standard-Lösung mit einer bekannten Ag-Konzentration aufgetragen und binden an den Ak. Nichtgebundenes Ag wird durch einen weiteren Waschvorgang entfernt und der mit einem Enzym gekoppelte Zweit-Ak (Detector-Ak) zugegeben. Je mehr Antigen in der Probe war umso mehr Zweit-Ak kann nun binden. Durch das Enzym wird im folgenden Schritt Substrat umgewandelt, was sich in einer Farbänderung zeigt, die mit einem Photometer gemessen werden kann. Anhand des mitgeführten Standards kann am Ende durch erstellen einer Eichkurve die Farbreaktion direkt mit der Antigen-Konzentration korreliert werden.

2.15.1 Material/ Reagenzien ELISA

- Antikörper und Zytokinstandards:	R&D (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) DuoSet ELISA Development System, jeweils Capture-Ak, Detector-Ak, Standard
Interleukin-6:	DY 406
Interleukin-10:	(Capture, Detector, Standard) DY 417
Interleukin-12p40:	(Capture, Detector, Standard) DY 499

	TNF α :	(Capture, Detector, Standard) DY 410
- PBS:	NaCl (Roth, Art. 3957.2)	137mM
	KCl (Merck, 1.04936.1000)	2,7mM
	Na ₂ HPO ₄ (Fluka Biochimika, # 71640)	8,1mM
	KH ₂ PO ₄ (Merck, 1.05104.1000)	1,5mM
	über 0,2 μ m-Filter filtriert	
- Wasch-Puffer:	0,05% Tween20 (Sigma P 1379) in PBS, pH 7,4	
- Blocking-Puffer:	1% BSA (Bovines Serum Albumin, Sigma A-3294) und 5% Sucrose (Sigma S-9378) in PBS	
- Reagent Diluent:	1% BSA in PBS	
- Phosphat-Citrat- Puffer:	Na ₂ HPO ₄ 0,2M (Fluka Biochimika, # 71640)	25,7ml
	C ₆ H ₈ O ₇ 0,1M (Citronensäure, Roth, Art. 6490.2)	24,3ml
	H ₂ O	50ml
	→ auf pH 5 einstellen.	
- Substrat-Lösung:	Phosphat-Citrat-Puffer	10ml/Platte
	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine Tabletten (Sigma T-3405)	1Tbl./Platte
	H ₂ O ₂ (Aldrich 21, 676-3)	2 μ l/Platte
- Stop-Lösung:	2N H ₂ SO ₄ (Merck, 1.00731.1000) in H ₂ O	
- Streptavidin HRP:	R&D Systems (Minneapolis, MN), Part. No. 890803, Lot AEM 232052	
- NUNC TM Maxisorp Immunoplate:	# 439454, über Fisher Scientific Nidderau, Germany	

2.15.2 Protokoll ELISA

1. Capture-Ak (IL-6: 50 μ l, IL-10: 55,6 μ l, IL-12p40: 50 μ l, TNF α : 40 μ l auf 10ml PBS) 100 μ l/well auf NUNC Maxisorp Immunoplate coaten.
2. Oberste Platte mit Paraffin abdecken. Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur.
3. 3x mit 400 μ l/well Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Mal gut trocken klopfen.
4. Blocken mit 200 μ l/well Blocking-Puffer. Mindestens 1h bei RT inkubieren, 30min vor Ende Proben auftauen.
5. Waschen wie unter 3.
6. Standard (IL-6: 250 μ l à 4480pg/ml, IL-10: 250 μ l à 8960pg/ml, IL-12p40: 250 μ l à 8960pg/ml, TNF α : 250 μ l à 8960pg/ml plus 250 μ l Medium) 1:2 nach unten

verdünnen. Proben in Tripletts nach Schema auftragen, dabei je nach Verdünnung (IL-6: 1:4, IL-10: 1:2, IL-12p40: 1:2, TNF α : 1:4) Medium vorlegen. Mindestens 2h bei Raumtemperatur inkubieren, bzw. bei 4° über Nacht.

7. Waschen wie unter 3.
8. Detektor-Antikörper (IL-6: 50 μ l, IL-10: 80 μ l, IL-12p40: 50 μ l, TNF α : 60 μ l auf 10ml in Reagent Diluent) 100 μ l/well daraufgeben und 2h bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Waschen wie unter 3.
10. Streptavidin HRP (50 μ l in 10ml Reagent Diluent) 100 μ l/ well, 20min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Waschen wie unter 3.
12. 100 μ l/well Substrat-Lösung daraufgeben, 20min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubieren.
13. 50 μ l Stop-Lösung daraufgeben, wenn der Standard titriert gefärbt ist.
14. Messen der Optischen Dichte bei 450nm/570nm.
15. Auswerten.

3 Ergebnisse

3.1 Plasmid-Expression

Nach der Klonierung der Plasmide pC-OVA und pFLAG-OVA (siehe Abb.3) durch R.M. Vabulas und deren Vermehrung durch Transformation von Bakterien und Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen EndoFree™ Plasmid Kits, mussten diese zunächst auf ihre Funktion überprüft werden. Dazu wurden humane, embryonale Nierenzellen (293T-Zellen), die besonders gut transfizierbar sind (Sena-Esteves et al., 1999), mit dem jeweiligen Plasmid mittels Elektroporation transfiziert und deren Überstand bzw. lysierte Zellsuspension im WesternBlot auf das Plasmidprodukt untersucht.

Abbildung 3

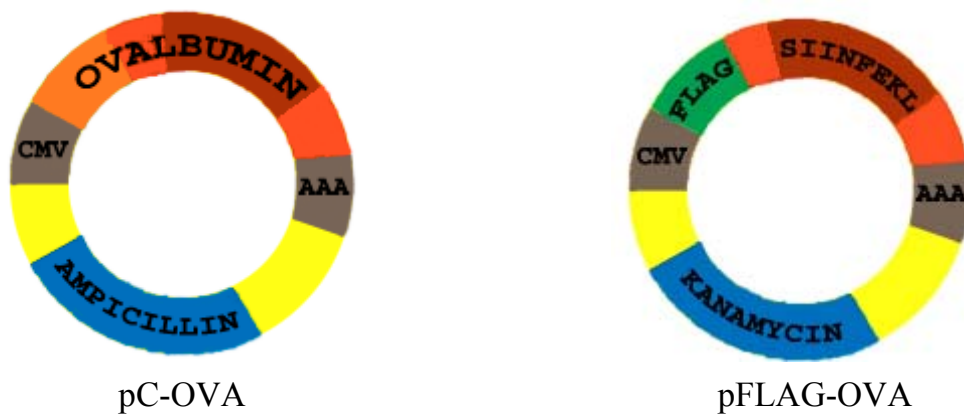


Abb.3: Schematische Darstellung der Plasmide pC-OVA und pFLAG-OVA

CMV = CMV-Promotor, AAA = Poly A-Ende, Ampicillin und Kanamycin = Antibiotikaresistenz, FLAG = 8-Aminosäuren-Peptid (AspTyrLysAsp-AspAspAspLys), SIINFEKL = Peptid 257-264 von Ovalbumin (SerIleIleAsnPheGluLysLeu)

Zum Nachweis der Ovalbumin-Produktion und Sekretion wurden die pC-OVA transfizierten Zellen lysiert ('Zellen') bzw. deren Überstände ('Überstand') gewonnen und mittels WesternBlot auf das Vorhandensein von Ovalbumin untersucht (Abb. 4). Bei Expression des pC-OVA Plasmids konnte sowohl intrazelluläre Proteinexpression als auch Sekretion nachgewiesen werden. Bei Transfektion mit pFLAG-OVA hingegen konnte keine Sekretion bei positiver intrazellulärer Proteinexpression nachgewiesen werden. Hier spielt die Struktur von pFLAG-OVA eine Rolle, das nur einen Teil der Ovalbumin-Sequenz darunter SIINFEKL, die Peptidsequenz 257-264 von Ovalbumin, enthält und dem die ersten Aminosäure-Sequenzen, die für die

Sekretion des Genprodukts kodieren, fehlen (Meek et al., 1982). pC-OVA dagegen enthält die komplette Sequenz für Ovalbumin und verfügt somit über den für die Sekretion kodierenden Gen-Abschnitt. Als Negativ-Kontrolle wurde pcDNA3, ein leerer Plasmidvektor verwendet. Darüberhinaus korrelierte die eingesetzte Plasmidmenge mit der Proteinmenge, die nachgewiesen werden konnte. Eine intrazelluläre posttranslationale Beeinflussung der Proteinexpression und -sekretion kann somit ausgeschlossen werden.

Abbildung 4

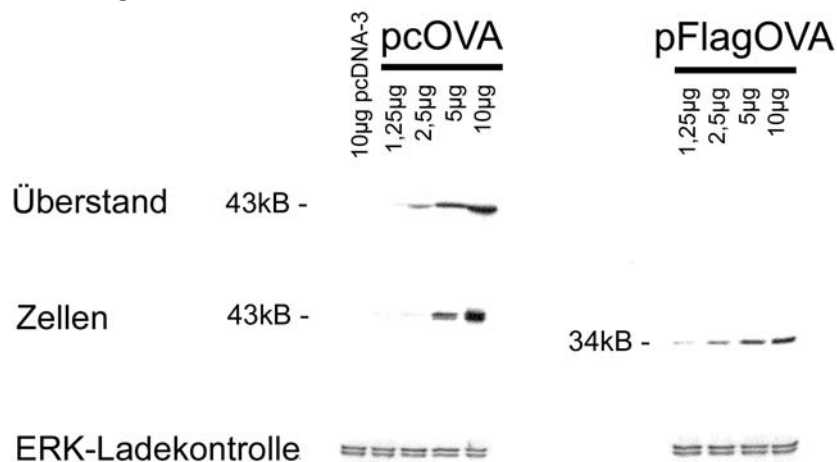


Abb.4: Expression bzw. Sekretion der Plasmidprodukte von pC-OVA und pFLAG-OVA

Jeweils 3×10^6 293T-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen pC-OVA, pFLAG-OVA oder pcDNA3 transfiziert. Nach 24h Inkubation wurde der Überstand gewonnen und die Zellen lysiert. Anschließend wurden die Suspensionen auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die einzelnen Bestandteile mittels SDS-PAGE in ihr Molekulargewicht aufgetrennt. Nach dem Semidry-Transfer wurde der Blot mittels Anti-OVA (43kB) bzw. Anti-FLAG (34kB) gefärbt. Als Ladekontrolle wurde ERK mittels anti-ERK Antikörper angefärbt. Dargestellt ist eines von drei identischen Experimenten.

3.2 Präsentation des Plasmidprodukts

Wie mittels WesternBlot gezeigt, können pC-OVA und pFLAG-OVA von Zellen aufgenommen, repliziert und Ovalbumin bei pC-OVA auch sezerniert werden. Es stellte sich nun die Frage, ob und welches der beiden Plasmide bzw. derer Peptide besser auf der Zelloberfläche präsentiert werden kann und somit andere Immunzellen stimulieren kann. Da pC-OVA bzw. sein Proteinprodukt, wie oben beschrieben, sezerniert wird und genaue Prozessierungsvorgänge bisher noch nicht bekannt sind, geht man davon aus, dass nach der Sekretion von Ovalbumin zunächst eine Wiederaufnahme des Peptids stattfinden muss bevor dieses auf der Zelloberfläche

präsentiert werden kann bzw. direkt eine intrazelluläre Prozessierung erfolgen muss (Michalek et al., 1992). pFLAG-OVA hingegen wird nicht sezerniert; dies könnte eine Ursache für eine mögliche bessere Präsentation sein.

Um diesen Fragen nachzugehen wurde ein Präsentations-Assay durchgeführt. Dabei wird die Präsentation von SIINFEKL auf der Oberfläche der transfizierten ANA-Zellen untersucht. Gemessen wird die LacZ-Aktivität von B3Z-Zellen, einem SIINFEKL/K^b-spezifischem T-Zell-Hybridom. Die transfizierten ANA-Zellen werden mit B3Z koinkubiert. Die durch SIINFEKL aktivierten B3Z-Zellen färben sie sich blau und können am Mikroskop ausgezählt werden.

Die Proteinprodukte der Plasmide pC-OVA und pFLAG-OVA können auf Makrophagen präsentiert werden. Wie vermutet kann das SIINFEKL des pFLAG-OVA etwas besser präsentiert werden, wobei der Unterschied zwischen pFLAG-OVA und pC-OVA nicht als signifikant bezeichnet werden kann (Abb.5).

Abbildung 5

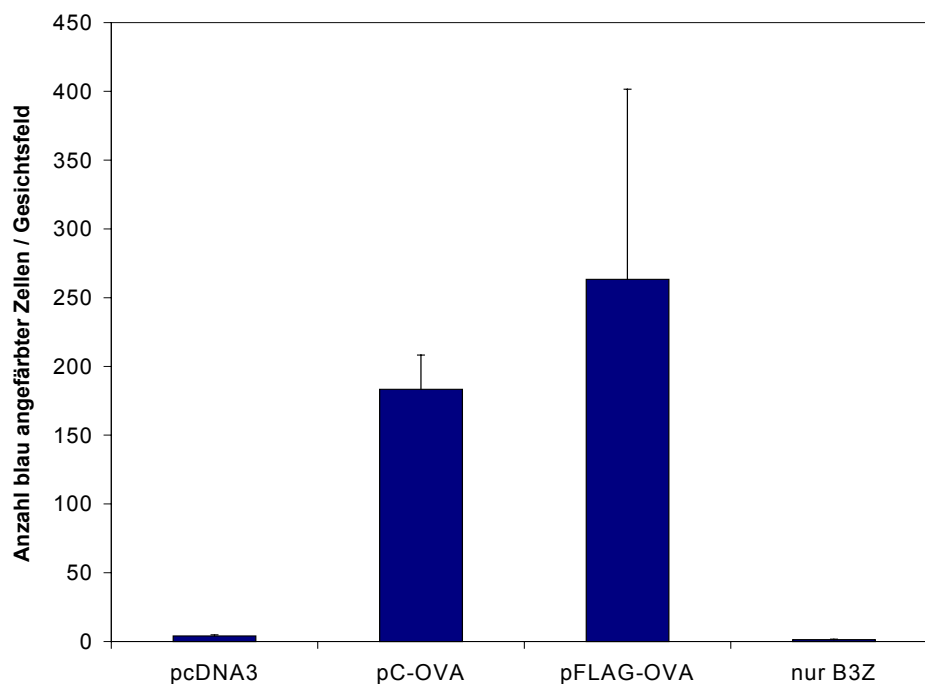


Abb.5: pC-OVA und pFLAG-OVA führen zu identischer SIINFEKL-Präsentation auf der Zelloberfläche

4×10^6 ANA-Zellen wurden mit je $20 \mu\text{g}$ pC-OVA, pFLAG-OVA oder pcDNA3 transfiziert und zur Stimulation von B3Z-Zellen (SIINFEKL-spezifischen T-Zell-Hybridom, dessen LacZ-Gen unter der Kontrolle des IL-2 Promoter steht) verwendet. Nach 12 h wurde der Entwickler dazugegeben und nach weiteren 4h die Zahl der blau angefarbten Zellen pro Gesichtsfeld im Lichtmikroskop bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von drei unabhängigen Experimenten.

3.3 Etablierung eines Vakzinierungsprotokolls

Wie in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben zeigen CpG-Motive eine starke Adjuvans-Aktivität. Sie verstärken innerhalb von DNA-Vakzinen die Immunogenität des zu transkribierenden Antigens (Klinman et al., 1997; Tighe et al., 1998). Es galt daher zuerst nachzuweisen, dass die in den hier verwendeten Plasmiden vorkommenden CpG-Motive ausreichend sind SIINFEKL-spezifische CTLs nach Immunisierung zu induzieren. Des Weiteren sollte ein optimales Vakzinierungsprotokoll entwickelt werden. Dabei stellten sich die Anzahl an Boost-Injektionen und die Art der Immunisierung (intramuskulär versus subkutan) zur Frage (Abb. 6).

Abbildung 6

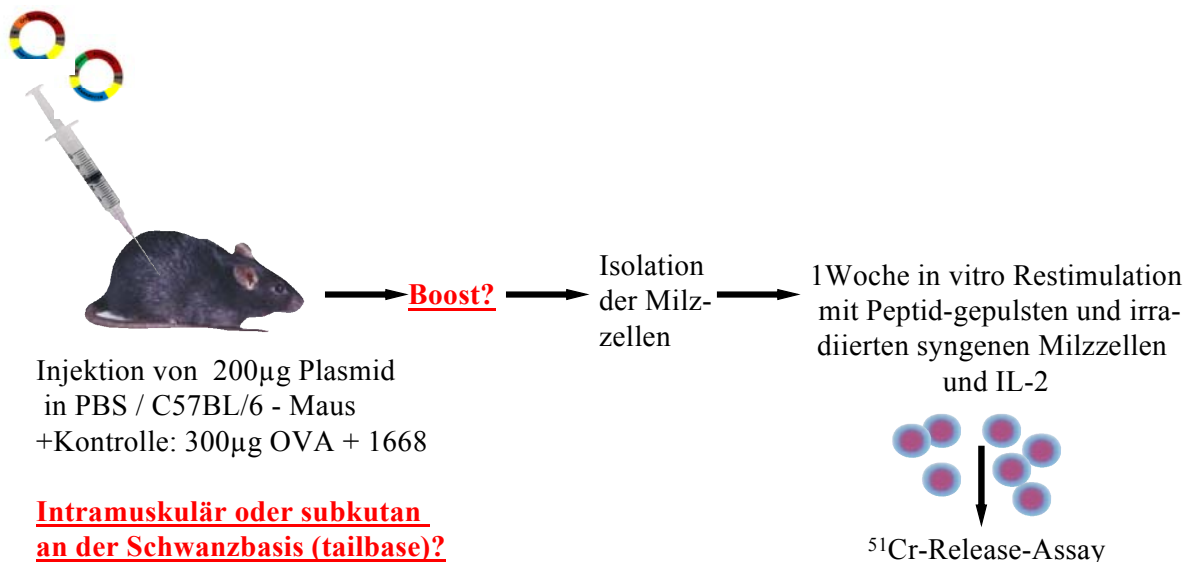


Abb.6: Schematische Darstellung des Immunsierungsprotokolls mit den Variablen Applikation (intramuskulär oder subkutan) und Anzahl der Boost-Injektionen.

Wie der obenstehenden Graphik zu entnehmen ist, finden sich im Immunsierungsprotokoll gegebene feste Faktoren wie der Injektion von 200µg Plasmid und die einwöchige in vitro Restimulation. Bei 200µg Plasmid handelt es sich um eine relativ hohe Menge, die so gewählt wurde um eine sichere Immunantwort hervorzurufen. Die einwöchige Restimulationsphase geht auf Erfahrungswerte (Vabulas et al., 2000) zurück. Die variablen Faktoren Applikationsweise und Anzahl der Boost-Injektionen wurden im Folgenden an C57BL/6 Mäusen untersucht.

Basierend auf hypothetischen Überlegungen begannen wir ein Schema mit einmaliger intramuskulärer Injektion von Plasmid bei der Etablierung des

Vakzinierungsprotokolls. Hierbei zeigte sich, dass keine signifikante Induktion Peptid-spezifischer CTLs (bestimmt mittels Lyse-Assay) im Vergleich zu Vakzinierung unter Verwendung von freiem CpG 1668 als Adjuvans erzielen ließ (Abb. 7).

Abbildung 7

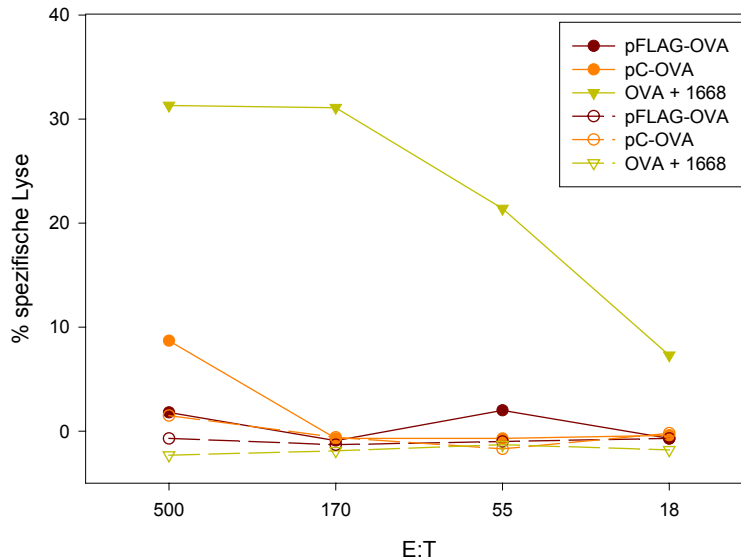


Abb.7: Einmalige i.m.-Injektion von Plasmid führt zu keiner signifikanten Induktion Peptid-spezifischer CTLs

7 Tage nach einer einmaligen intramuskulären Injektion (M. Quadrizeps) von 200µg Plasmid (in 100µl PBS) wurden die Milzzellen von C57BL/6 Mäusen *in vitro* restimuliert. Nach einer Woche wurde ein ⁵¹Cr-Release-Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die spezifische Lyse bei unterschiedlichen E:T (Effektor- zu Target-Zell)Ratios. Die Ergebnisse repräsentieren je Plasmid zwei Tiere. Ausgefüllte Symbole: Peptid (SIINFEKL) gepulste EL4-Target-Zellen; leere Symbole: nicht gepulste Target-Zellen.

Da eine einmalige i.m.-Injektion zu keiner CTL-Induktion führte, wurde im nächsten Ansatz versucht die mittels Boost-Injektion zu verbessern. Überraschenderweise zeigte eine zusätzliche Boost-Injektion an Tag 14 erneut keine Induktion spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten durch das Plasmid. Als Positivkontrolle diente wiederum eine Vakzinierung mit Ovalbumin und freiem CpG 1668 als Adjuvans, was zu signifikanten Lysewerten von über 60% führte (Abb. 8).

Abbildung 8

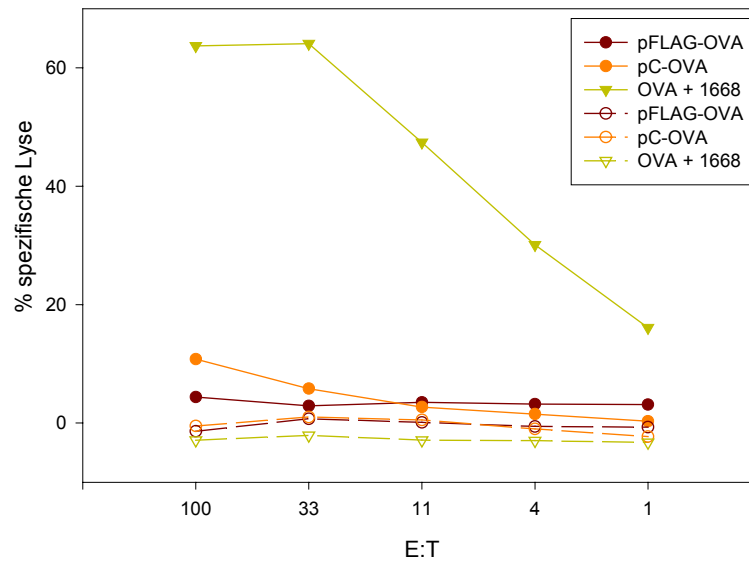


Abb.8: Zweimalige i.m.-Injektion von Plasmid führt zu keiner signifikanten Induktion Peptid-spezifischer CTLs

7 Tage nach einer zweimaligen intramuskulären Injektion (M. Quadrizeps) von 200µg Plasmid (in 100µl PBS) wurden die Milzzellen von C57BL/6 Mäusen *in vitro* restimuliert. Nach einer Woche wurde ein ^{51}Cr -Release Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die spezifische Lyse bei unterschiedlichen E:T (Effektor- zu Target-Zell) Ratios. Die Ergebnisse repräsentieren je Plasmid zwei Tiere. Ausgefüllte Symbole: Peptid (SIINFEKL) gepulste EL4- Target-Zellen; leere Symbole: nicht gepulste Target-Zellen.

Da eine i.m. Injektion trotz Boost-Injektion zu keiner signifikanten CTL-Induktion führte, untersuchten wir im nächsten Schritt einen anderen Applikationsweg (s.c.). Nach einmaliger subkutaner Verabreichung konnte keine signifikante Lyse induziert werden (Abb.9), jedoch nach einer zusätzlichen Injektion an Tag 14 konnte erstmals SIINFEKL-spezifische CTLs induziert werden (Abb.10).

Abbildung 9

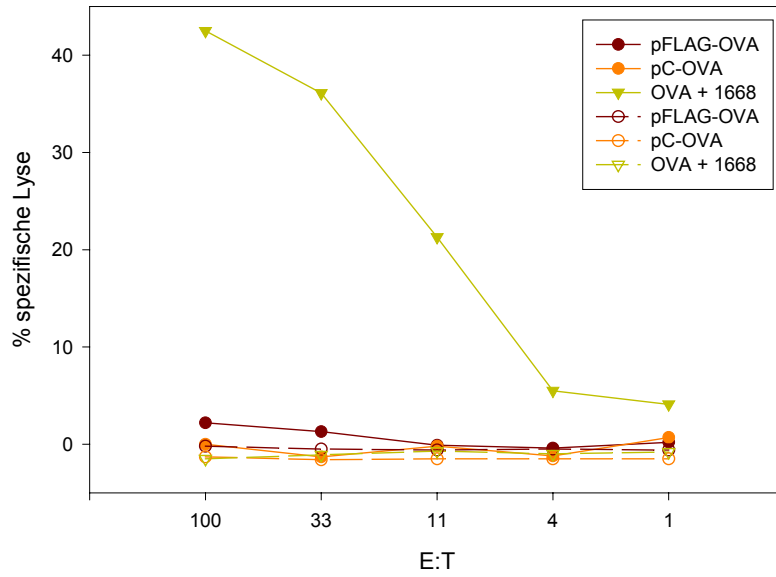


Abbildung 10

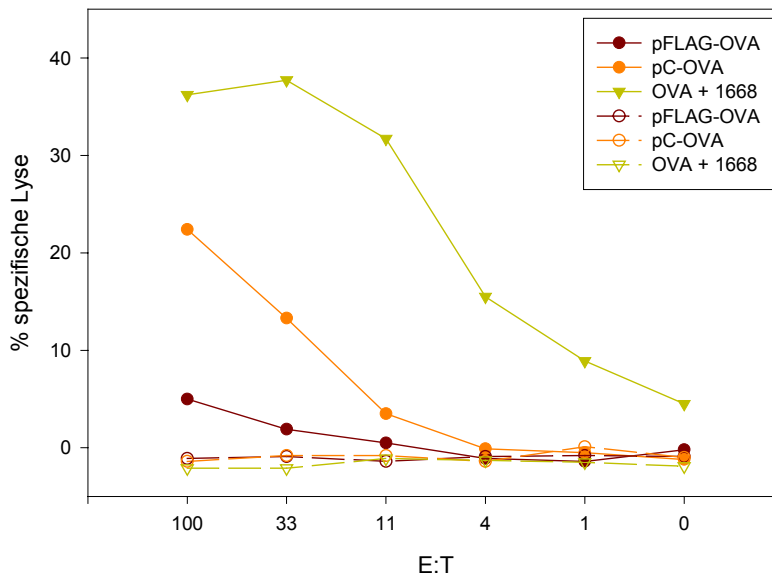


Abb.9 und 10: Einmalige s.c.-Injektion von Plasmid führt zu keiner signifikanten Induktion Peptid-spezifischer CTLs, zweimalige s.c.-Injektion jedoch schon.

7 Tage nach einer einmaligen (Abb.9) bzw. zweimaligen (Abb.10) subkutanen Injektion (Tailbase) von 200µg Plasmid (in 100µl PBS) wurden die Milzzellen von C57BL/6 Mäusen *in vitro* restimuliert. Nach einer Woche wurde ein ⁵¹Cr-Release Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die spezifische Lyse bei unterschiedlichen E:T (Effektor- zu Target-Zell) Ratios. Die Ergebnisse repräsentieren je Plasmid zwei Tiere. Ausgefüllte Symbole: Peptid (SIINFEKL) gepulste EL4- Target-Zellen; leere Symbole: nicht gepulste Target-Zellen.

Im nächsten Versuch sollte der Frage nachgegangen werden inwiefern repetitive Boost-Injektionen die Lyse der Targetzellen noch steigern könnte. Hierzu wurden die Versuchstiere dreimal im zehntägigen Abstand mit Plasmid-DNA vakziniert. Hierbei zeigte sich, dass mittels dieses Protokolls eine spezifische Lyse im Bereich von den 1668 Cpg + OVA Werten erreicht wurde (Abb. 11). Interessanterweise wurden für die beiden Plasmide trotz unterschiedlicher Sekretion identische Lysewerte der induzierten CTLs gemessen. Dieses so etablierte Protokoll mit dreimaliger s.c.-Injektion wurde in den folgenden Untersuchungen unverändert verwendet.

Abbildung 11

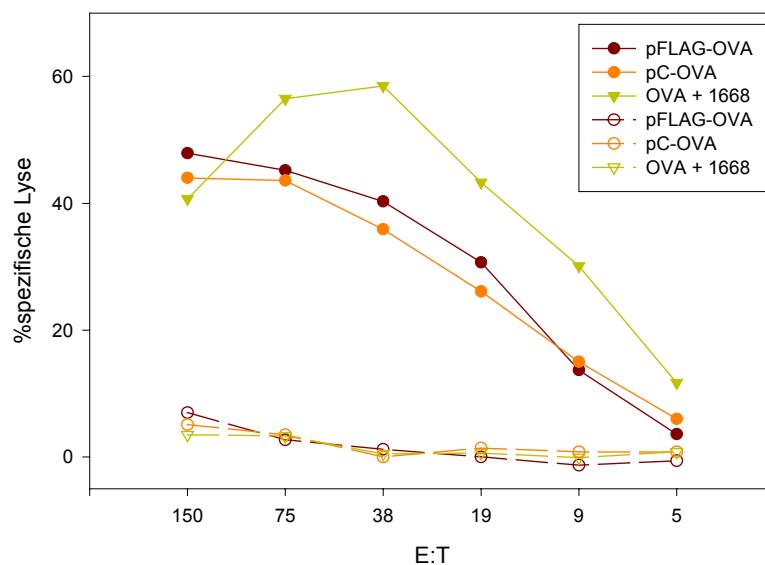


Abb.11: Dreimalige s.c.-Injektion von Plasmid führt zu peptidspezifischer Lyse

7 Tage nach dreimaliger subkutanen Injektion (Tailbase) von 200µg Plasmid (in 100µl PBS) wurden die Milzzellen von C57BL/6 Mäusen *in vitro* restimuliert. Nach einer Woche wurde ein ⁵¹Cr-Release Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die spezifische Lyse bei unterschiedlichen E:T (Effektor- zu Target-Zell)Ratios. Die Ergebnisse repräsentieren je Plasmid zwei Tiere. Ausgefüllte Symbole: Peptid (SIINFEKL) gepulste EL4- Target-Zellen; leere Symbole: nicht gepulste Target-Zellen.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde für die späteren Versuche mit Knockout-Tieren das folgende Protokoll festgelegt:

- Tag 0: Priming mit 200µg Plasmid/ Maus s.c. tailbase
- Tag 10: erster Boost mit 200µg Plasmid/ Maus s.c. tailbase
- Tag 20: zweiter Boost mit 200µg Plasmid/ Maus s.c. tailbase
- Tag 27: Milzentnahme und in-vitro-Restimulation
- Tag 34: CTL-Assay

3.4 Zytokinproduktion nach Stimulation mit pDNA

Unter 3.3 konnte gezeigt werden, dass pDNA bei Wildtyp-Mäusen peptidspezifische Lyse induzieren kann. Es stellte sich daher die Frage, ob neben einer Lyse, welche wahrscheinlich CTL-vermittelt ist, auch andere Zellpopulationen stimuliert werden können. Es wurde daher die Zytokinproduktion von B-Zellen, DCs und Makrophagen *in vitro* nach pC-OVA Stimulation untersucht. Bei allen drei Zelllinien ließen sich zelltypische Zytokine durch pDNA induzieren (Abb. 12-14).

Bei der Stimulation von B-Zellen mit Plasmid ließen sich dosisabhängig IL-6-Zytokinspiegel im Bereich einer LPS-Induktion von 1µg/ml induzieren. Eine Stimulation mit dem am besten stimulierenden CpG 1668 führte allerdings zu noch höheren IL-6-Spiegeln (Abb. 12A). IL-12-Produktion konnte ebenfalls dosisabhängig durch pDNA in B-Zellen induziert werden. Dabei zeigten sich ähnlich hohe Werte wie durch CpG 1668 Stimulation und deutlich höhere als nach LPS-Stimulation (Abb. 12B). Korrelierend mit den vorangehenden Ergebnissen wurden für das T_{H1}-antagonistische Zytokin IL-10 (Mosmann et al., 1990) deutlich geringere Spiegel verglichen mit LPS und CpG 1668 Induktion gemessen (Abb. 12C). Eine Immunstimulation durch pDNA könnte somit verstärkt eine Verschiebung zu einer T_{H1}-Immunantwort bewirken.

Abbildung 12

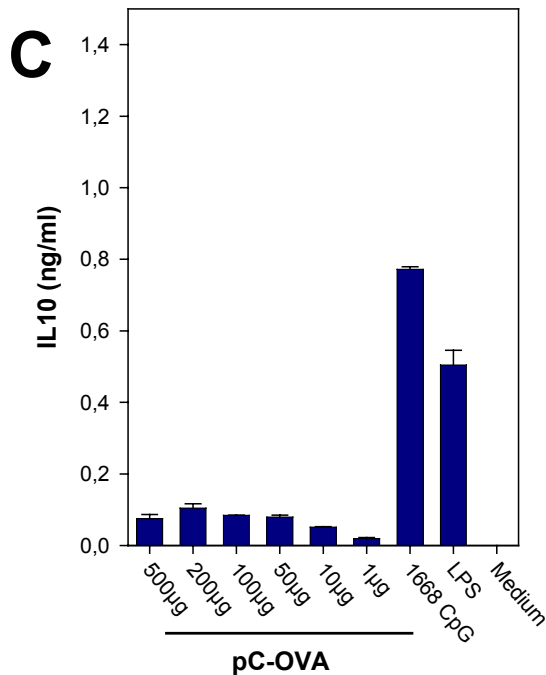
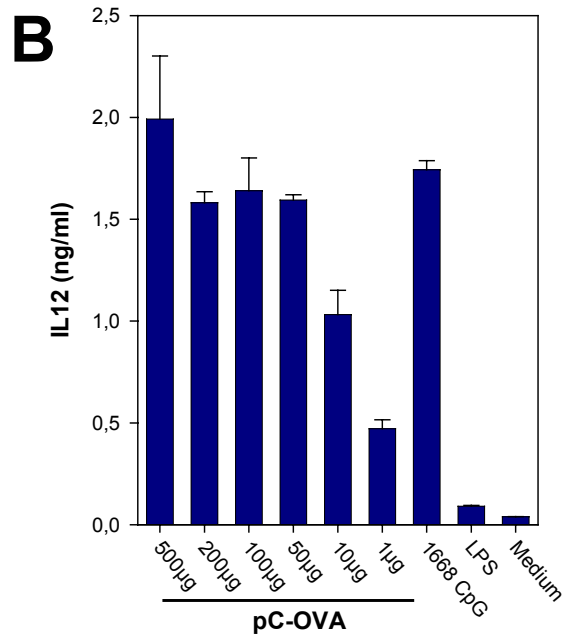
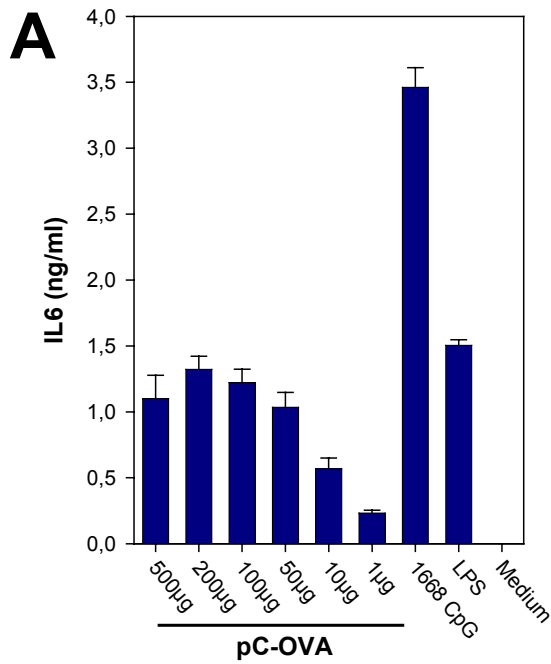


Abb.12: pDNA induziert B-Zellen zur Produktion von IL-6 und IL-12 im Ausmaß einer Stimulation mit LPS bzw. CpG 1668, während die IL-10 Produktion weit dahinter zurückbleibt.

Aufgereinigte B-Zellen (5×10^6 /well/ml) aus der C57BL/6 Maus wurden 24h mit den angegebenen Mengen pC-OVA Plasmid-DNA, $5 \mu\text{M}$ 1668 CpG bzw. $1 \mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Anschließend Zytokin-Bestimmung (IL-6: Abb. 12A, IL-12: Abb. 12B, IL-10: Abb. 12C) mit dem R&D DuoSet ELISA Development System.

Die Stimulation der murinen Makrophagen-Zelllinie J774 mit nackter pDNA induzierte erneut eine annähernd so hohe Interleukin-Produktion wie die CpG- oder LPS-Stimulation. IL-6 (Abb. 13A) wird wie IL-12 (Abb. 13B) plasmiddosisabhängig produziert und beide erreichen dabei annähernd so hohe Werte wie nach LPS bzw. CpG 1668 Stimulation.

Abbildung 13

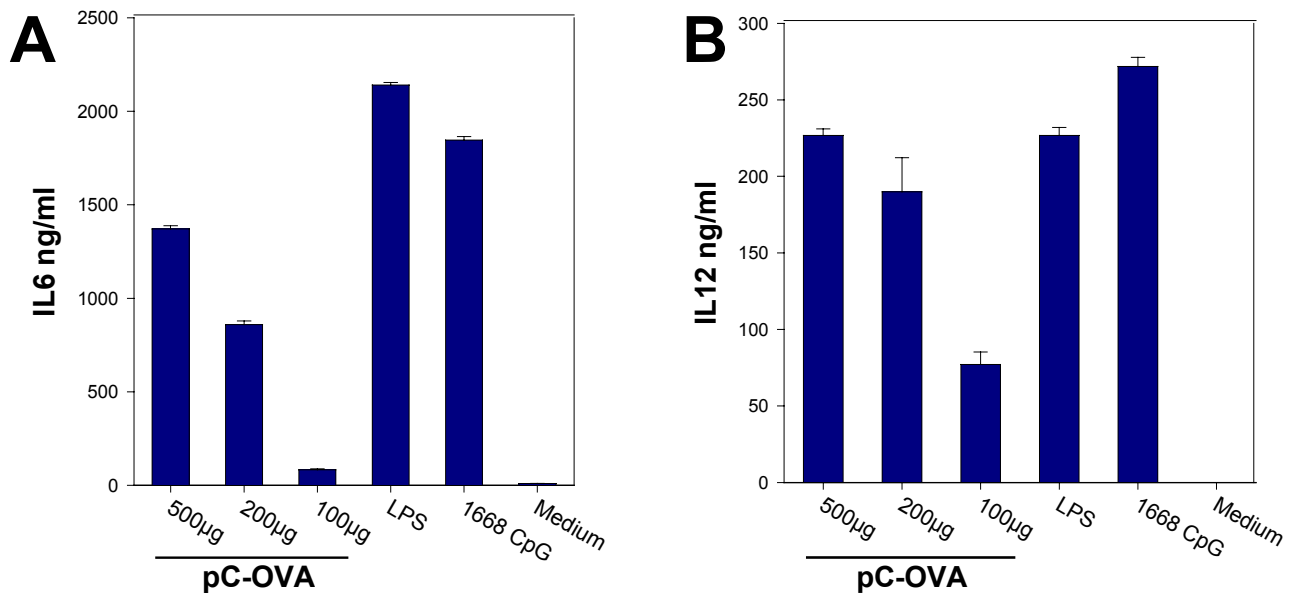


Abb.13: pDNA stimuliert Makrophagen zur Produktion von IL-6 und IL-12

Aufgereinigte J774-Zellen (3×10^6 /well/ml) aus der C57BL/6 Maus wurden 24h mit den angegebenen Mengen pC-OVA Plasmid-DNA, $5 \mu\text{M}$ 1668 CpG bzw. $1 \mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Anschließend Zytokin-Bestimmung (IL-6: Abb. 13A, IL-12: Abb.13B) mit dem R&D DuoSet ELISA Development System.

Ein weitere Zellpopulation, die bei der angeborenen Immunabwehr eine wichtige Rolle spielt, sind die dendritischen Zellen. Es stellte sich daher die Frage, inwiefern pDNA auch diese Zellen zu stimulieren vermag. Hierzu wurde ebenfalls die Zytokinproduktion von wt-BMD-DCs nach Stimulation mit pC-OVA mit der Stimulation durch CpG 1668 oder LPS verglichen (Abb. 14).

Abbildung 14

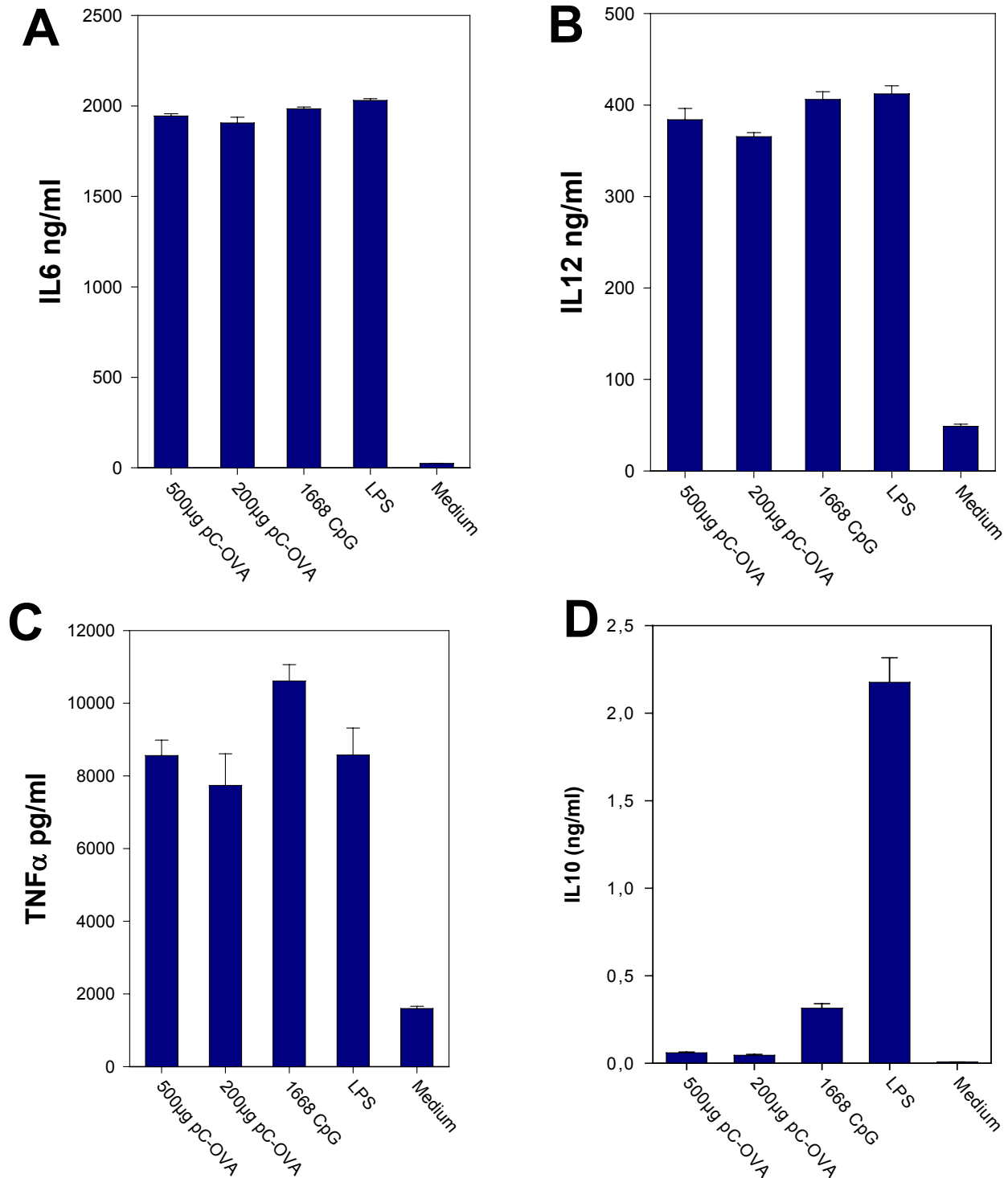


Abb.14: pDNA induziert bei BMD-DCs die Produktion von IL-6, IL-12 und TNF- α , jedoch kein IL-10

BMD-DCs (3×10^6 /well/ml) aus der C57BL/6 Maus wurden 24h mit den angegebenen Mengen pC-OVA Plasmid-DNA, $5 \mu\text{M}$ 1668 CpG bzw. $1 \mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Anschließend Zytokin-Bestimmung (IL-6: Abb. 14A, IL-12: Abb. 14B, TNF- α : Abb.14C, IL-10: Abb. 14D) mit dem R&D DuoSet ELISA Development System.

Plasmid-DNA stimuliert bei BMD-DCs die IL-6- (Abb. 14A), die IL-12- (Abb.14B), sowie die TNF- α -Produktion (Abb.14C) in gleichem Maße wie LPS und 1668 CpG-DNA. Die geringe IL-10 Bildung (Abb. 14D) nach pDNA-Stimulation gibt erneut einen Hinweis auf die wahrscheinliche Verschiebung der Immunantwort in Richtung T_{H1} .

Abbildung 15

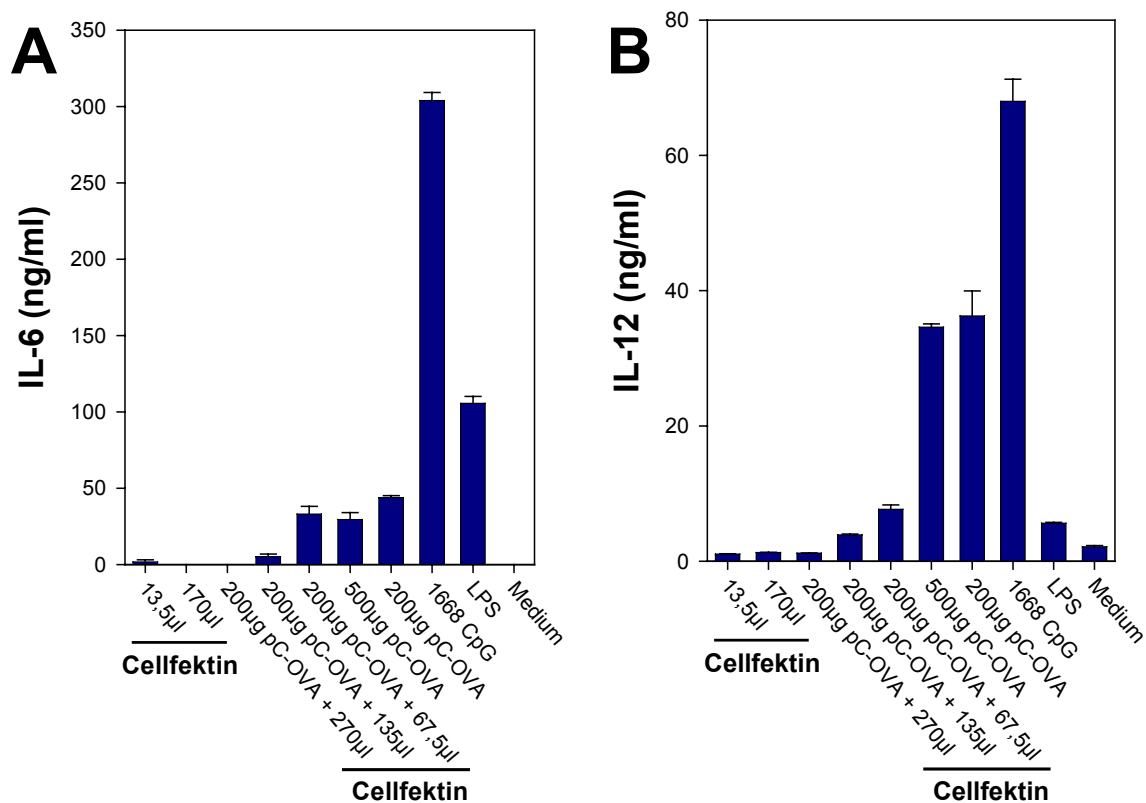


Abb.15: Cellfektin verbessert die Plasmidaufnahme in die Zellen nicht und führt somit auch zu keiner verstärkten Zytokin-Bildung im Vergleich zur reinen pDNA-Stimulation
 Aufgereinigte B-Zellen (3×10^6 /well/ml) aus der C57BL/6 Maus wurden 24h mit den angegebenen Mengen pC-OVA Plasmid-DNA, 5 μ M 1668 CpG bzw. 1 μ g/ml LPS stimuliert. Die eingesetzten Cellfektin-Mengen wurden nach Erfahrungswerten anderer Institutsmitglieder berechnet. Anschließend Zytokin-Bestimmung (IL-6: Abb. 15A, IL-10: Abb.15B) mit dem R&D DuoSet ELISA Development System.

Da in den vorangehenden Experimenten eine deutliche Korrelation zwischen der eingesetzten Plasmidmenge und der induzierten Zytokinproduktion bestand, sollte in einem weiteren Versuch untersucht werden, ob mittels liposomaler Transfektion (Cellfektin) die Plasmidaufnahme in B-Zellen und somit die Zytokinproduktion durch

pDNA-Stimulation verbessert werden kann (Gregoriadis et al., 1996). Es gelang jedoch nicht durch Cellfektin die Zytokininduktion zu steigern (Abb. 15).

Eine mögliche bessere Plasmid-Aufnahme scheint jedoch durch toxische Nebenwirkungen der Cellfektin-Behandlung negiert zu werden. Hinweise hierfür liefern morphologische Veränderungen der Cellfektin-behandelten B-Zellen, die sich lichtmikroskopisch vermehrt granuliert und mit schlecht abgrenzbaren Zellmembranen darstellten (Daten nicht photographisch dokumentiert).

Es wurden darüber hinaus Stimulationsversuche mit Chloroquin zur Verbesserung der Plasmid-Transfektion bzw. Polymyxin B zur Unterdrückung von LPS-Effekten durchgeführt. Es gelang jedoch nicht die erwarteten Reaktionen zu induzieren und dadurch die entsprechenden Auswirkungen auf die Zytokinproduktion zu erreichen (Daten nicht gezeigt).

3.5 Induktion kostimulatorischer Oberflächenmoleküle durch Plasmid-Stimulation

Zur Induktion einer Immunantwort ist neben dem primären Signal, der Interaktion des TCR mit dem präsentierten Peptid, ein zweites Signal, vermittelt durch kostimulatorische Moleküle nötig, um eine Aktivierung zu ermöglichen und die Anergieinduktion zu vermeiden (Heeg and Wagner, 1995; Janeway and Bottomly, 1994). Es soll daher untersucht werden, ob die Adjuvans-Effekte von pDNA möglicherweise auf einer vermehrten Induktion kostimulatorischer Moleküle beruht. Hierzu wurden sowohl B-Zellen (Abb. 16) als auch dendritische Zellen (Abb. 17) auf ihre Expression von CD40 und CD86 untersucht.

Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Dosen an pDNA bzw. CpG 1668 oder LPS als Positivkontrollen inkubiert und deren Oberflächenexpression von CD40 und CD86 nach Antikörperfärbung mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt.

Die Untersuchungen zeigten, dass pDNA Exposition in hohen Dosen zu einer erhöhten Oberflächenexpression an CD40 auf B-Zellen führt, die allerdings deutlich schwächer als nach LPS oder CpG Stimulation ist (Abb. 16A). Die CD86 Expression hingegen konnte bereits durch geringe Dosen an pDNA induziert werden, und erreicht Fluoreszenz-Werte in den aktivierten Subpopulationen, die denen nach LPS oder CpG Induktion vergleichbar sind (Abb. 16B). Mit abnehmender Konzentration des Plasmids nimmt die Anzahl der CD86-positiven Zellen ab, nicht jedoch die mittlere Fluoreszenz der Ak-positiven Zellen. Verglichen mit CpG 1668 scheint pDNA nicht qualitativ unterlegen zu sein, jedoch quantitativ.

Abbildung 16

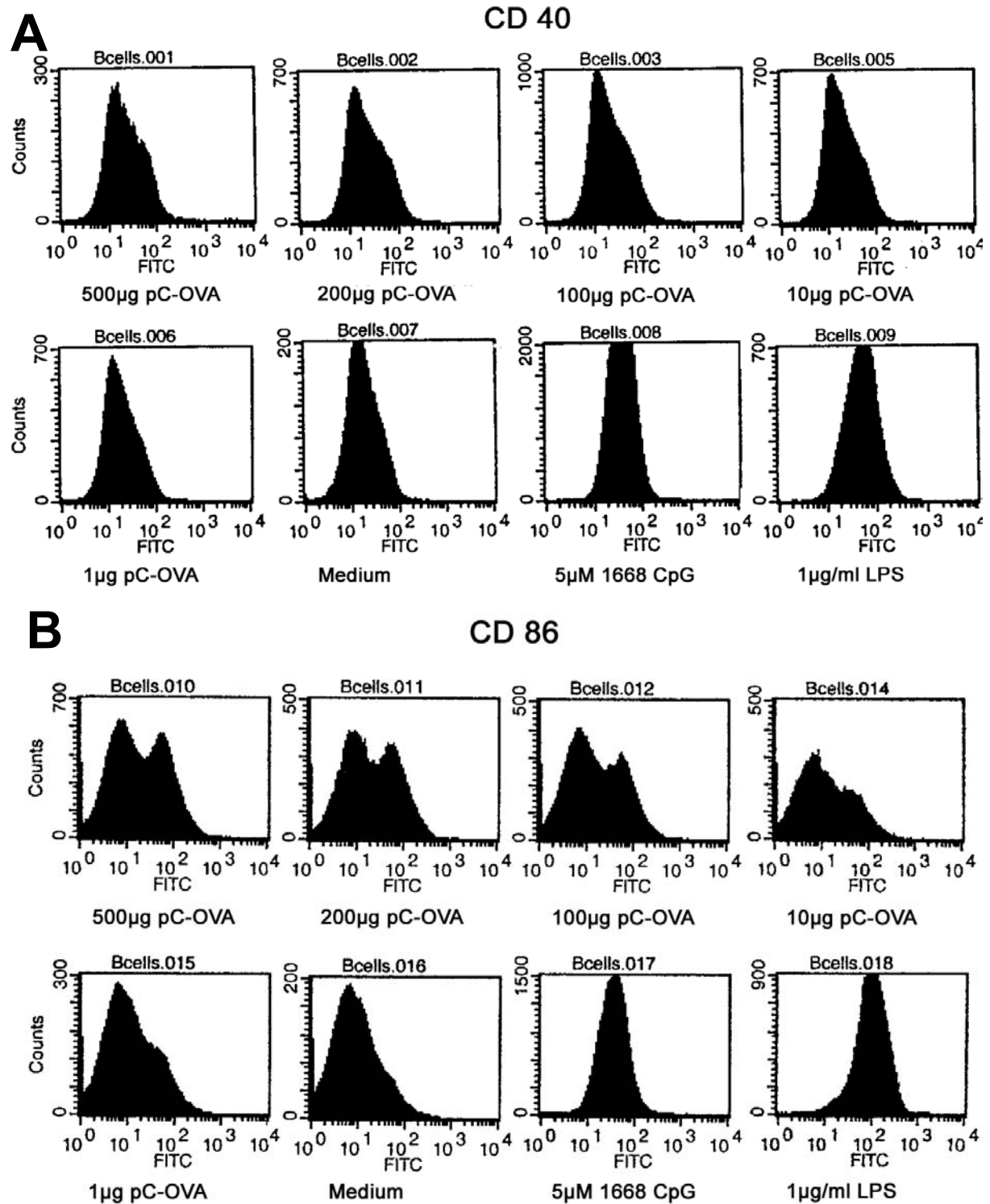
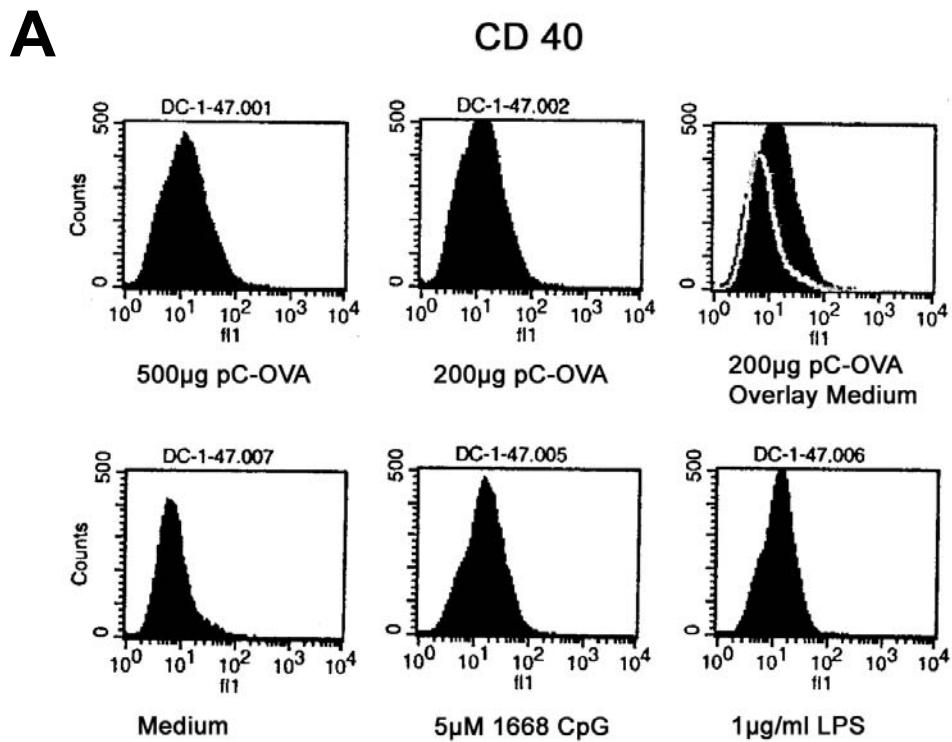


Abb.16: CD40/CD86 Oberflächenexpression von B-Zellen nach pC-OVA-Stimulation

Aufgereinigte B-Zellen (5×10^6 /well/ml) aus der C57BL/6 Maus wurden 24h mit den angegebenen Mengen pC-OVA Plasmid-DNA, 5µM 1668 CpG bzw. 1µg/ml LPS stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Ak gegen CD19 und CD40 (Abb. 16A) bzw. CD86 (Abb. 16B) angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Ähnlich zu den vorgenannten Experimenten sollte eine mögliche pDNA-vermittelte Beeinflussung der Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle auf dendritischen Zellen untersucht werden (Abb. 17). Sowohl CD40, als auch CD86 wurden durch pC-OVA-Stimulation vermehrt auf DCs exprimiert. Die Fluoreszenz-Intensitäten waren für beide Moleküle vergleichbar mit denen nach LPS oder 1668 CpG Stimulation. Außerdem scheint die Expression auf DCs weniger dosisabhängig zu sein als bei B-Zellen.

Abbildung 17



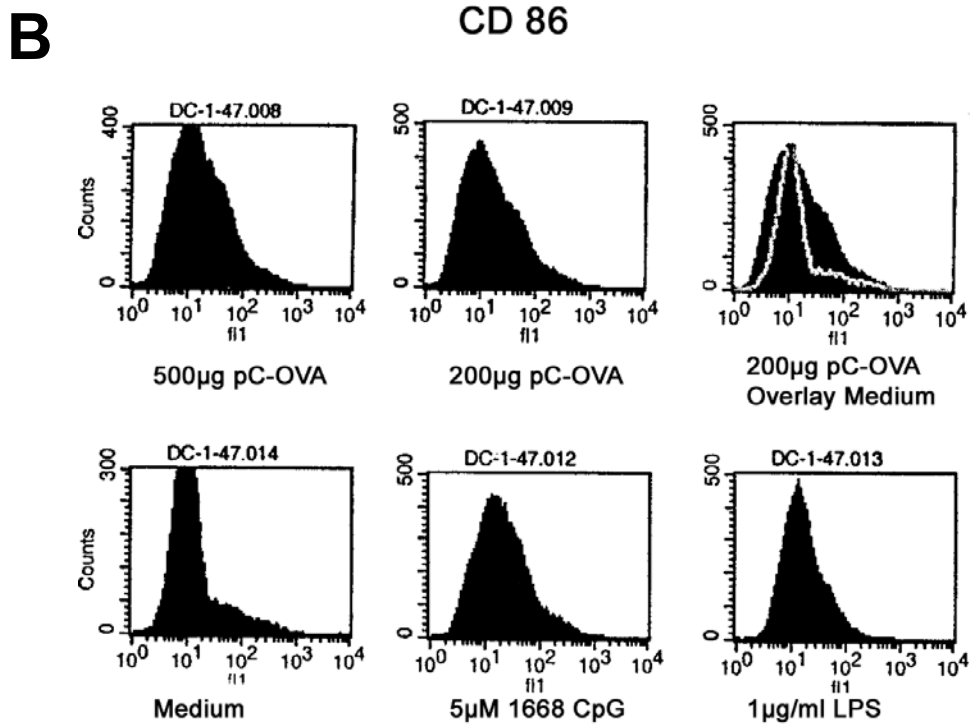


Abb.17: CD40/CD86 Oberflächenexpression von BMD-DCs nach pC-OVA-Stimulation

BMD-DCs (3×10^6 /well/ml) aus der C57BL/6 Maus wurden 24h mit den angegebenen Mengen pC-OVA Plasmid-DNA, 5µM 1668 CpG bzw. 1µg/ml LPS stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Ak gegen CD11c und CD40 (Abb. 17A) bzw. CD86 (Abb. 17B) angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.6 Mitogenität von Plasmid-DNA

Für einzelsträngige CpG-DNA wurde vorher beschrieben, dass sie auf murine B-Zellen, die TLR9 exprimieren, mitogen wirken kann (Krieg et al., 1995). Daher untersuchten wir, ob die doppelsträngige pDNA pC-OVA ähnliche Effekte auf aufgereinigte murine B-Zellen bewirkt. Als Positivkontrolle wurde die einzelsträngige CpG-DNA 1668 verwendet. Als weiterer Stimulator der angeborenen Immunantwort wurde LPS in den Versuchsansatz aufgenommen. Um eine mögliche Vermittlung von mitogenen pDNA-Signalen via TLR9 nachzuweisen wurden im folgenden Experiment TLR9^{+/+} bzw. TLR9^{-/-} B-Zellen bezüglich ihrer Proliferation auf o.g. Stimuli untersucht (Abb. 18). Überraschenderweise zeigte sich im [³H] Thymidin-Assay, dass pC-OVA nicht in der Lage war, B-Zell-Proliferation zu induzieren. Die vorher beschriebene TLR9-Abhängigkeit von CpG-vermittelter B-Zell-Proliferation konnte reproduziert werden. Im Einklang mit der Literatur war die TLR4-vermittelte LPS-Proliferation in der TLR9-knockout B-Zelle unverändert im Vergleich zu ihrem wt-Korrelat.

Abbildung 18

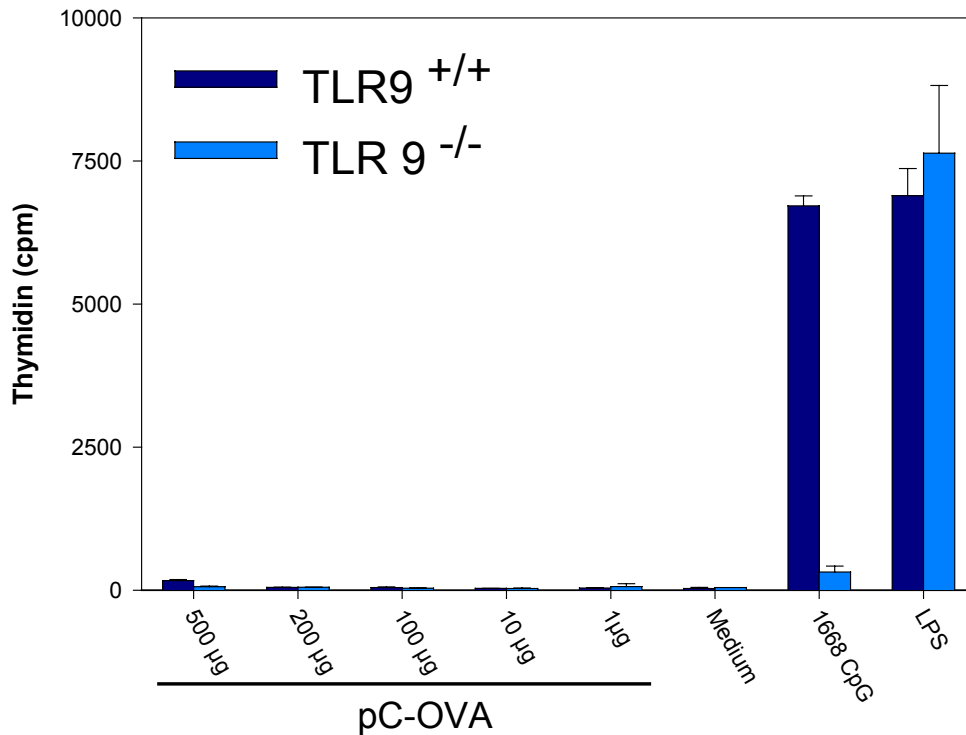


Abb.18: Plasmid-DNA wirkt nicht mitogen auf B-Zellen

2×10^4 /well mit magnetischen Beads aufgereinigte B-Zellen aus der Milz von wt- oder TLR9^{-/-}-Mäusen wurden 48h mit den gezeigten Dosen pDNA (pC-OVA), 1668 CpG-DNA (5µM) oder LPS (1µg/ml) stimuliert. Die Mitogenität wurde mittels der [³H] Thymidin Aufnahme gemessen. Die Daten repräsentieren drei verschiedene Experimente.

3.7 Plasmid-DNA aktiviert DCs via TLR9

CD11c-positive DCs, einschließlich einer IFN- α produzierenden Untergruppe von plasmazytoiden DCs, können unter Zugabe von humanem Flt3 Ligand (Flt3L) in vitro aus Knochenmarkzellen generiert werden (Gilliet et al., 2002). Im Gegensatz zu humanen pDCs, die von konventionellen Typ B CpG-ODNs besser als von Typ A CpG-ODNs aktiviert werden (Krug et al., 2001; Verthelyi et al., 2001), können murine pDCs von beiden Typen TLR9-abhängig induziert (Hemmi et al., 2002; Sparwasser et al., 1998) werden. Man weiß, dass das Imidazoquinolin R-848 DCs über TLR7 aktiviert (Hemmi et al., 2002). Pam3Cys (Tripalmitoyl-Cystein-Seryl-(Lysyl)3-Lysin) als synthetisches Analogon eines bakteriellen Lipoproteins aktiviert das Immunsystem über TLR2 (Aliprantis et al., 1999) und poly(I:C) über TLR3 (Alexopoulou et al., 2001). In Kooperation mit Hubertus Hochrein wurde das Ansprechen von Flt3L-kultivierten BMD-DCs von wt- und von TLR9-knockout-Mäusen auf pC-OVA

Plasmid-DNA mit etablierten Stimuli (ssCpG-ODN 1668 (Typ B), ssCpG-ODN 2216 (Typ A), R-848, LPS, Pam3Cys und poly(I:C)) verglichen.

Abbildung 19

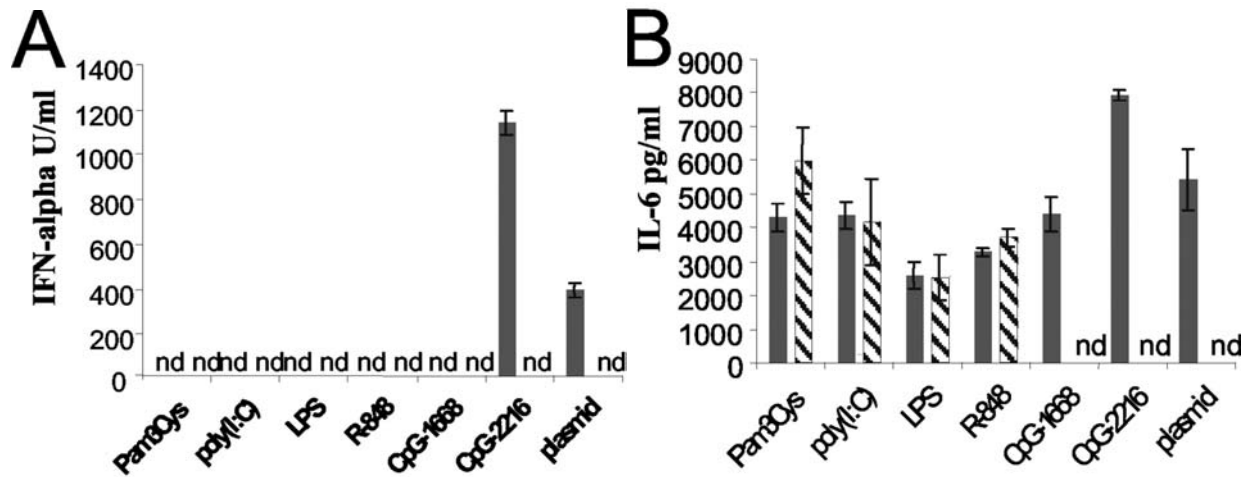


Abb.19: Die durch Plasmid induzierte Zytokinproduktion von Flt3L-kultivierten BMD-DCs ist TLR9 abhängig

Es wurden insgesamt 1×10^5 FL-BM von wt (gefüllter Balken) und TLR9-Knockout (gestreifter Balken) Mäusen in $200 \mu\text{l}$ über 26h mit den angegebenen Stimuli inkubiert: Pam3Cys ($1 \mu\text{g/ml}$), LPS ($1 \mu\text{g/ml}$), R-848 ($1 \mu\text{g/ml}$), poly (I:C) ($100 \mu\text{g/ml}$), CpG-1668 ($0,5 \mu\text{M}$), CpG-2216 ($0,5 \mu\text{M}$) und pDNA ($200 \mu\text{g/ml}$). Die Kultur-Überstände wurden mittels ELISA auf IFN- α (Abb. 19A) und IL-6 (Abb. 19B) untersucht. Die Standardabweichungen zeigen die Variation von Proben-Dupletts an. Die Daten repräsentieren mehr als 3 identische Experimente. Die Sensitivität (ELISA) betrug für IFN- α 32 U/ml und für IL-6 16pg/ml. nd = nicht detektierbar.

Sowohl CpG 2216, als auch Plasmid-DNA sind den etablierten Stimuli bei der Induktion der Wildtyp-BMD-DCs zur IFN α -Produktion deutlich (Abb. 19A) und bei der IL-6-Produktion geringgradig (Abb. 19B) überlegen. Dabei fiel die Wirkung des Plasmids aber gegenüber dem Typ A CpG-2216 geringer aus. In beiden Fällen zeigte sich eine TLR9-Abhängigkeit der pDNA-Stimulation, da die TLR9^{-/-}-DCs mit nicht detektierbaren Zytokinproduktionen reagierten. Alle andern o.g. Stimuli induzierten die IL-6 Produktion TLR9-unabhängig.

Daraufhin wurden wt und TLR9^{-/-} Flt3L generierte BMD-DCs durch Zell-Sorting in CD45RA^{hoch} CD11b^{niedrig} CD11c^{hoch} plasmazytoide DCs und CD45RA^{niedrig} CD11b^{hoch} CD11c^{hoch} konventionelle DCs (cDCs) aufgetrennt. Von der Wildtyp-Maus abstammende und somit TLR9^{+/+} pDCs produzierten auf Stimulation von pDNA hin

IFN- α und IL-6. Diese Zytokinproduktion wurde nur von Typ A CpG-ODN 2216 übertroffen. Die wt-cDCs reagierten auf pC-OVA mit IL-6 Produktion, aber waren nicht in der Lage IFN- α zu bilden. Knockout pDCs sowie cDCs sprachen nicht auf Plasmid-DNA an (Daten werden nicht gezeigt).

Abbildung 20

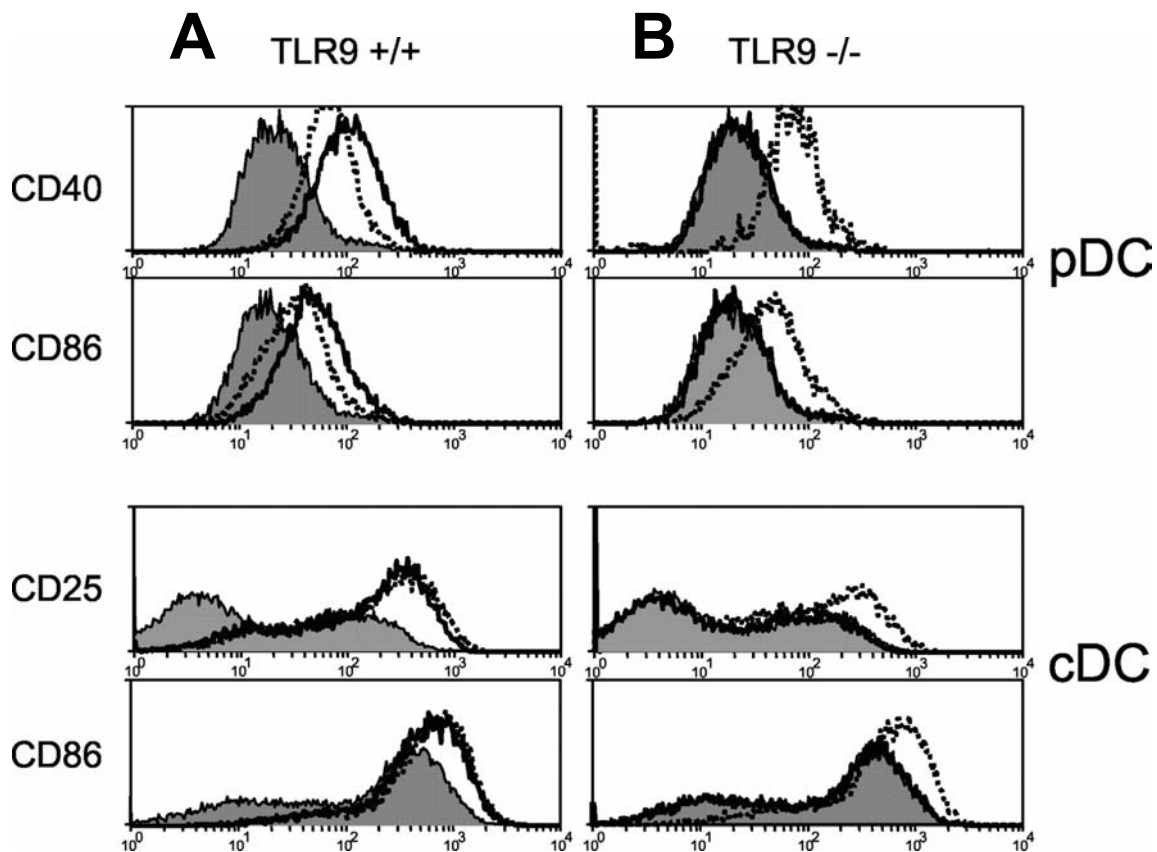


Abb.20: Die Hochregulation von Oberflächenmolekülen durch Plasmid-Stimulation ist TLR9 abhängig

Flt3L-kultivierte BMD-DCs von wt- (Abb. 20A) oder k.o.-Mäusen (Abb. 20B) wurden an Tag 8 der Kultur als plasmazytoide DCs (pDCs) ($CD11c^{hoch}$, $CD45RA^{hoch}$, $CD11b^{niedrig}$) oder konventionelle DCs (cDCs) ($CD11c^{hoch}$, $CD45RA^{niedrig}$, $CD11b^{hoch}$) gesortet. Die DC-Subtypen wurden 16h mit Plasmid (200 μ g/ml, durchgehende Linie), R-848 (1 μ g/ml, gepunktete Linie), oder nur Medium (ausgefülltes graues Areal) inkubiert und anschließend die Oberflächen-Expression von CD40 und CD86 für pDCs (oberer Teil der Abbildung) oder CD25 und CD86 für cDCs (unterer Teil) durch FACS-Analyse bestimmt. Zwei weitere Experimente erbrachten ähnliche Ergebnisse.

Gleichzeitig wurde der Frage nachgegangen, ob die beiden DC-Subtypen, was die pDNA vermittelte Hochregulation von CD40, CD86 oder CD25 anbelangt, ebenfalls TLR9-abhängig sind. Man kann bei plasmazytoiden und konventionellen wt (TLR9^{+/+})

DCs eindeutig eine erhöhte Expression der Oberflächenmarker beobachten (Abb. 20A). Die TLR9^{-/-} DC-Subtypen (Abb. 20B) dagegen sprechen nicht auf die Stimulation von pC-OVA an. Sie reagieren allerdings auf den TLR7 Liganden R-848 mit der Expression von CD40, CD86 und CD25. Letztere deutet darauf hin, dass die negative Reaktion auf Plasmid-DNA auf das Fehlen von Toll-like-Rezeptor 9 zurückzuführen ist.

3.8 TLR9-unabhängige CTL-Induktion nach Plasmidimmunisierung

Im Gegensatz zur allgemeinen Annahme, dass im humanen System Monozyten in Abwesenheit von pDCs auf Grund fehlender TLR9-Expression nicht auf CpG-Motive ansprechen (Hornung et al., 2002), gelang es Sato et al. humane Monozyten mit immunstimulatorischer CpG-DNA zu transfizieren und damit starke Typ I Interferon und IL-12 Produktion zu erzielen (Sato et al., 1996).

Wie unter 3.7 dargestellt aktiviert pDNA in vitro sowohl plasmazytoide als auch konventionelle murine DCs über TLR9. Auf diesen Ergebnissen basierend erwarteten wir bei der Immunisierung TLR9-ko Mäuse mit der Plasmid-DNA pC-OVA ein defizientes Vakzinierungsergebnis.

Abbildung 21

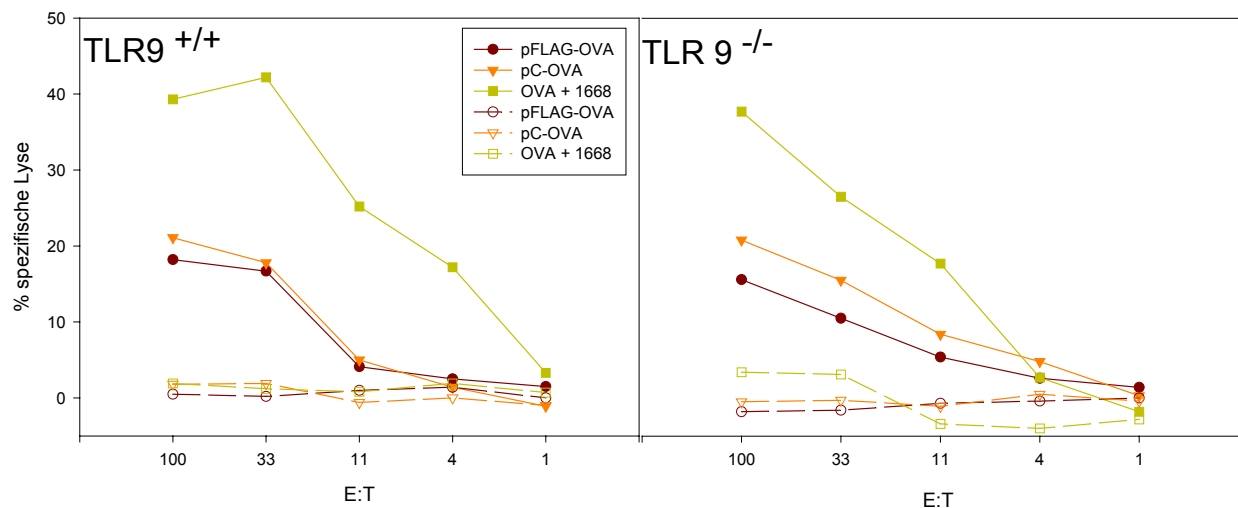


Abb.21: Peptidspezifische Lyse plasmidaktivierter TLR9^{+/+} und TLR9^{-/-} CTLs

7 Tage nach dreimaliger subkutaner Injektion (Tailbase) von 200µg Plasmid (in 100µl PBS) wurden die Milzzellen von C57BL/6 Mäusen in vitro restimuliert. Nach einer Woche wurde ein ⁵¹Cr-Release Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die spezifische Lyse bei unterschiedlichen E:T (Effektor- zu Target-Zell)Ratios. Die Ergebnisse repräsentieren je Plasmid zwei Tiere. Ausgefüllte Symbole: Peptid (SIINFEKL) gepulste EL4- Target-Zellen; leere Symbole: nicht gepulste Target-Zellen.

In den weiteren Experimenten verwendeten wir das unter 3.3 etablierte Vakzinierungsprotokoll. Überraschenderweise zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Lyseaktivität zwischen TLR9^{-/-} und TLR9^{+/+} CTLs nach Plasmid-Vakzinierung (Abb. 21).

Da dies gegen die Erwartungen und bisherigen Ergebnisse, dass pDNA TLR9-abhängig wirkt, sprach, wurde die Ursache dieses Ergebnisses zunächst bei Material und Versuchsdurchführung gesucht. Eine mögliche Endotoxinkontamination der Plasmid-DNA konnte durch eine quantitative Endotoxinbestimmung der verwendeten Plasmidchargen durch die ACILA GMN (Gesellschaft für Mikrobiologische Nährmedien), Möhrfelden-Walldorf, ausgeschlossen werden. Die Möglichkeit einer Tierverwechslung wurde durch ein PCR-Screening der parenteralen Linie untersucht. Eine weitere Möglichkeit der Experimentbeeinflussung können unterschiedliche Chargen von pC-OVA darstellen. Es wurden daher unterschiedliche Chargen simultan in einem Experiment verwendet. Die oben beschriebenen Beobachtungen ließen sich jedoch gut reproduzieren. Wiederum zeigten die TLR9^{-/-} CTLs die gleiche Lyseaktivität nach Vakzinierung wie die wt-CTLs (Abb. 22).

Abbildung 22

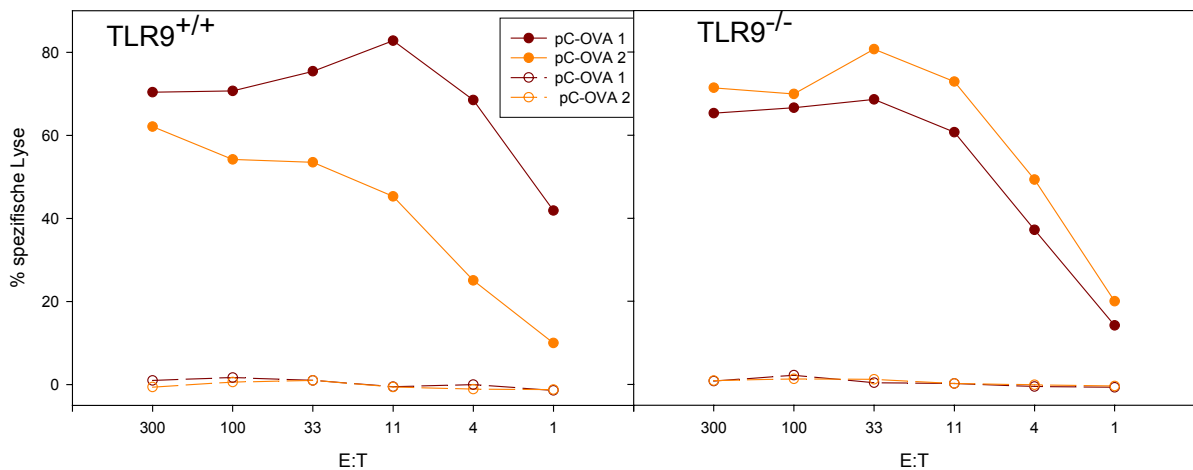


Abb.22: Peptidspezifische Lyse plasmidaktivierter TLR9^{+/+} und TLR9^{-/-} CTLs

7 Tage nach dreimaliger subkutaner Injektion (Tailbase) von 200µg Plasmid (in 100µl PBS) wurden die Milzzellen von C57BL/6 Mäusen *in vitro* restimuliert. Nach einer Woche wurde ein ⁵¹Cr-Release Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die spezifische Lyse bei unterschiedlichen E:T (Effektor- zu Target-Zell) Ratios. Die Ergebnisse repräsentieren je Plasmid zwei Tiere. Ausgefüllte Symbole: Peptid (SIINFEKL) gepulste EL4- Target-Zellen; leere Symbole: nicht gepulste Target-Zellen. pC-OVA 1 und pC-OVA 2 entsprechen zwei zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgereinigten Plasmid-Chargen.

Identische Lysewerte beim Vergleich von TLR9-ko CTLs und TLR9-wt CTLs könnten auch auf einer konstitutiv besseren Aktivierung der ko CTLs beruhen, die bei einer TLR9 Vermittlung von pDNA-Signalen die reduzierte Lyseaktivität verschleiern würde. Um diese Hypothese zu entkräften wurden in einem weiteren Experiment neben pC-OVA auch Tiere mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans (IFA) + OVA vakziniert. Es wird für IFA angenommen, dass dessen Adjuvans-Effekt nicht TLR9 vermittelt ist (Heit et al., 2003; Lim, 2003). Eine intrinsisch bessere Aktivierbarkeit der TLR9^{-/-} CTLs müsste daher höhere Lysewerte nach IFA zeigen. Dies bestätigte sich nicht. IFA-vakzinierte TLR-9^{-/-} CTLs zeigten im Vergleich zu wt-CTLs identische lytische Aktivität nach Vakzinierung (Abb. 23).

Abbildung 23

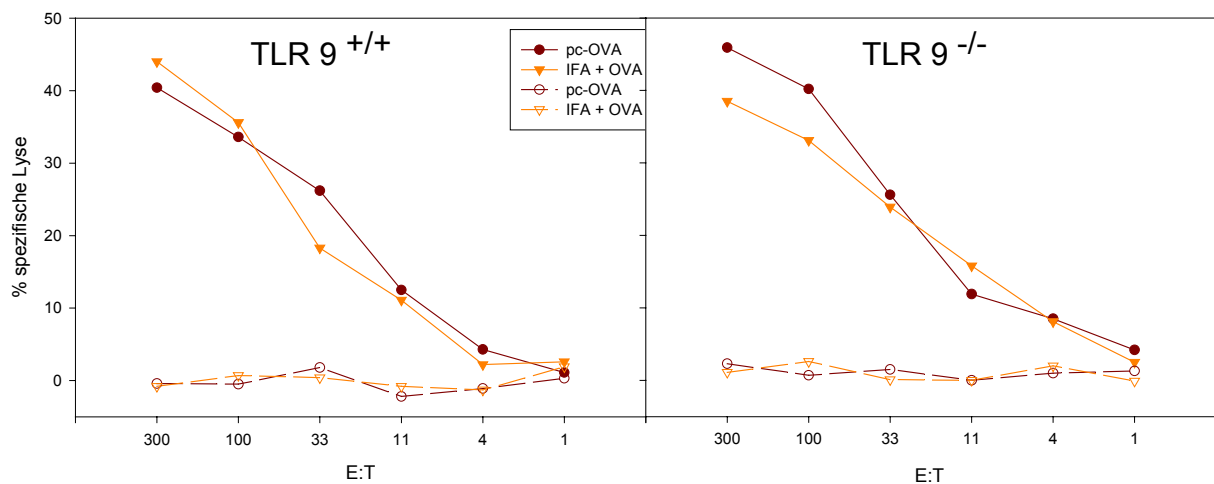


Abb.22: Peptidspezifische Lyse plasmidaktivierter TLR9^{+/+} und TLR9^{-/-} CTLs

7 Tage nach dreimaliger subkutaner Injektion (Tailbase) von 200µg Plasmid (in 100µl PBS) bzw. einmalig IFA+OVA wurden die Milzzellen von C57BL/6 Mäusen *in vitro* mit SIINFEKL restimuliert. Nach einer Woche wurde ein ⁵¹Cr-Release Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die spezifische Lyse bei unterschiedlichen E:T (Effektor- zu Target-Zell) Ratios. Die Ergebnisse repräsentieren je Plasmid zwei Tiere. Ausgefüllte Symbole: Peptid (SIINFEKL) gepulste EL4- Target-Zellen; leere Symbole: nicht gepulste Target-Zellen. IFA: inkomplettes Freund'sches Adjuvans.

3.9 Tetramer-Staining SIINFEKL-spezifischer CTLs

Da bei den oben dargestellten Experimenten die qualitative Charakterisierung (Lyseaktivität gepimter T-Zellen) ein *in vitro* Re-Priming zwischengeschaltet ist, besteht die Möglichkeit, dass dieser Schritt quantitative Zellzahl-Unterschiede an *in vivo* induzierten peptidspezifischen CTLs verschleiern. Daher wurde mittels Tetramer-

Technik der Prozentsatz an SIINFEKL-spezifischer T-Zellen innerhalb des Milzpool bestimmt (Abb. 24).

Abbildung 24

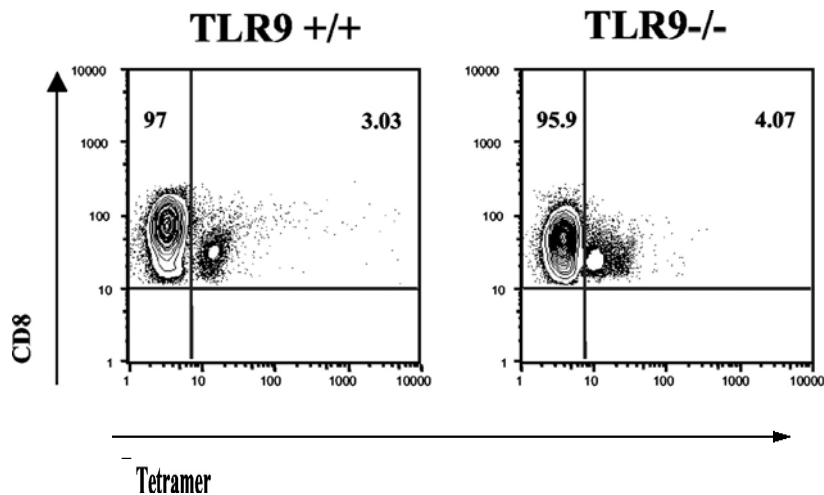


Abb.24: Bestimmung peptidspezifischer tetramerpositiver CD8⁺-T-Zellen nach pDNA-Vakzinierung in TLR9^{+/+} und TLR9^{-/-} -Mäusen.

Milzzellen von mit Plasmid-DNA immunisierten TLR9^{+/+} und TLR9^{-/-} Mäusen (wie unter 3.3 beschrieben) wurden mit einem H-2Kb/SIINFEKL Tetramer und anti CD8mAb gefärbt. Es wird das Tetramer Staining CD8⁺-Zellen gezeigt (mind. 100000 erfasste Zellen/ Sample).

Die Milzzellen der nicht geimpften wt-Negativ-Kontrolle exprimierten ~ 0,03-0,2% SIINFEKL Tetramer-bindender CD8⁺-T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Eine Plasmid-Vakzinierung von Wildtyp-Mäusen führte zu eine Expansion der peptidspezifischen T-Zellen auf 3,03%. In den TLR9^{-/-}-Mäusen führte die Vakzinierung zu identischen Anteilen an SIINFEKL-Tetramer-bindenden CD8⁺- T-Zellen von 4,07% .

Es lässt sich daher zusammenfassen, dass das pDNA-vermittelte Ag-spezifisches T-Zell-Priming sowohl qualitativ (Lyseaktivität), als auch quantitativ (Anteil peptidspezifischen T-Zellen) nicht durch die Abwesenheit von TLR9 in vivo beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu ist die Aktivierung von dendritischen Zellen in vitro durch TLR9 beeinflusst.

4 Diskussion

Zu Beginn der neunziger Jahre wurde nackte DNA als potenter Stimulus für die Induktion humoraler, sowie zellulärer Immunantworten postuliert (Donnelly et al., 1997; Raz et al., 1994; Tang et al., 1992). Einige Jahre später konnten spezifische CpG-Motive in der DNA als Urheber der Immunreaktion identifiziert werden (Krieg et al., 1995), die als Adjuvans für die immunogene Wirkung von DNA-Vakzinen unerlässlich sind (Sato et al., 1996). Die Entdeckung von DNA als Vakzin erwies sich insofern als attraktiv, da pDNA von professionellen APCs aufgenommen wird und das von ihr kodierte Protein transkribiert und translatiert wird. Entscheidender Vorteil gegenüber anderen Vakzinen ist, dass Plasmid-DNA besonders starke CTL-Antworten induzieren kann (Ulmer et al., 1993), weil die durch die DNA kodierten Proteine im Zytosol der transfizierten Zellen synthetisiert werden (Abbas et al., 2000b). Bis dahin waren nämlich nur attenuierte Lebend-Vakzine als Induktoren zellulärer Immunreaktionen bekannt, die aber zahlreiche Nebenwirkungen mit sich bringen (Gurunathan et al., 2000). Man geht davon aus, dass die Effektivität von pDNA-Vakzinen Summe folgender Eigenschaften ist: Die DNA kodiert für ein immunogenes Antigen, das über MHC prozessiert wird; sie stimuliert immunologisches Gedächtnis und beinhaltet ein potentes Adjuvans (Tighe et al., 1998). Die CpG-Motive entfalten ihre adjuvante Wirkung überwiegend von den in der Plasmid-DNA enthaltenen Antibiotikaresistenzgenen aus (Sato et al., 1996).

In dieser Arbeit wurde nun untersucht, welche Zellpopulationen durch Plasmidstimulation beeinflusst werden können. Dabei sollte untersucht werden inwiefern eine *in vitro* Stimulation, als auch *in vivo* Vakzinierung mittels pDNA beeinflusst wird. In weiteren Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob auch die Signalvermittlung von Plasmid-DNA ähnlich der von CpG-DNA Toll-like-Rezeptor 9 (Hemmi et al., 2000) vermittelt ist. Als Modell hierfür wurde ein Vakzinierungsmodell unter Verwendung von pDNA mit dem Protein Ovalbumin bzw. dessen Peptid SIINFEKL als Inserts etabliert.

4.1 pC-OVA und pFLAG-OVA

Plasmid-DNA stellt einen attraktiven Ansatz bei der Immunisierung dar, da größere Proteinsequenzen, ohne diese vorher produzieren zu müssen, in Zellen zur Präsentation eingebracht werden können. Es wurde früh gezeigt, dass Plasmid-DNA in lebende Zellen aufgenommen wird und das als Gensequenz enthaltene Protein produziert wird (Tang et al., 1992; Wolff et al., 1990).

Zunächst sollten auch für unsere Modell-Plasmide gezeigt werden, dass sie sich in Zellen transfizieren ließen und dort ihr Proteinprodukt bildeten. Es standen uns zwei verschiedene Plasmide zur Verfügung, von denen eines, pC-OVA, für das komplette Protein Ovalbumin kodiert. Das zweite Plasmid, pFLAG-OVA, enthält zwar die Gensequenz des antigen-wirkenden Peptids SIINFEKL (Aminosäuren 257-264 von Ovalbumin), aber nicht die für die Sekretion des Proteins aus der Zelle notwendige Sequenz in den ersten Abschnitten von Ovalbumin von circa 60 Aminosäuren (Meek et al., 1982). Mittels Westernblot wurde die Transfizierbarkeit der pDNA und Produktion ihrer Genprodukte nachgewiesen. Das nach Transfektion mit pC-OVA synthetisierte Ovalbumin wurde von den Zellen sezerniert, während das nach pFLAG-OVA-Transfektion produzierte SIINFEKL intrazellulär blieb; da, wie bereits erwähnt, die für die Sekretion zuständige Sequenz fehlt (Abb.4). Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass die mit pDNA transfizierten Zellen in der Lage sind beide Transkriptionsprodukte auf ihrer Oberfläche zu präsentieren (Abb.5).

Die DNA-Immunisierung stellt in der immunologischen Forschung ein sehr junges Gebiet dar. Gründe, die DNA-Immunisierung als eine vielversprechende Alternative zu Lebend-Vakzinen erscheinen lassen, sind folgende: die Möglichkeit mittels pDNA sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten hervorzurufen, kostengünstigere Herstellung, weniger aufwendige Sicherheitsmaßnahmen und besser kontrollierbare Nebenwirkungen (Gurunathan et al., 2000). Ähnlich wie bei den herkömmlichen Vakzinen können suffiziente Immunantworten oft auch bei pDNA nur durch Mehrfach-Injektionen erreicht werden (Davis et al., 1996; Fuller et al., 1996; Mustafa et al., 1997). Auch bei der Etablierung unseres Vakzinierungsprotokolls zeigte sich, dass das auf Ovalbumin basierende Modell bei einer einmaligen Injektion von Plasmid-DNA nicht in der Lage war spezifische CTLs zu induzieren (Abb. 7 und 9). Erst nach zwei zusätzlichen Boost-Injektionen konnte eine signifikante spezifische Lyse erreicht werden (Abb. 11). Damit einhergehend wurde zum Beispiel bereits 1996 eine Induktion β -Galactosidase-spezifischer CTLs durch dreimalige intradermale Immunisation beschrieben (Sato et al., 1996). Neben der Anzahl der Injektionen spielt auch die Form der Applikation eine Rolle bei der DNA-Immunisierung. Bisher wurden verschiedenste Injektions-Wege untersucht. Zu den Wichtigsten zählen intramuskulär, intradermal und subkutan (Fynan et al., 1993). Dabei ist die intramuskuläre Injektion in der Literatur die am häufigsten verwendete Applikationsform (Gurunathan et al., 2000). Wir verglichen daher bei der Aufstellung unseres Protokolls die i.m. (M. Quadrizeps) mit der s.c. (an der Schwanzbasis) Applikation von pDNA. Im Gegensatz zur gängigen Literaturmeinung fanden wir, dass sich mittels subkutaner Plasmid-

Verabreichung bessere Resultate erzielen ließen (Abb. 7-11). Wir entschieden uns daher für ein Protokoll mit dreimaliger subkutaner Tailbase-Injektion. Da sich pC-OVA und pFLAG-OVA bei der Vakzinierung und im vorangehenden Präsentations-Assay ähnlich verhielten, wurde bei den meisten folgenden Versuchen nur noch eines der beiden Plasmide (pC-OVA) untersucht.

4.2 Zytokinproduktion und Expression kostimulatorischer Moleküle durch Wildtyp-Zellen in vitro

Zytokine sind Polypeptide, die nach Antigen-Exposition in einem Organismus produziert werden und Immun- und Entzündungsreaktionen regulieren (Abbas et al., 2000a). Dabei kann man unterscheiden zwischen Zytokinen, die überwiegend bei der unspezifischen Abwehr eine Rolle spielen (z.B. TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, Typ I IFNs) und solchen, die bei der adaptiven Immunantwort involviert sind (z. B. IL-2, IL-4, IL-5). IFN- γ (Typ II IFN) stellt dabei ein wichtiges Verbindungsglied zwischen den beiden Reaktionstypen dar, da seine Produktion durch das Hauptzytokin der frühen angeborenen Immunantwort, IL-12, stimuliert wird und es selbst das Signalzytokin der T_H1-vermittelten zellulären Abwehr ist. Antagonistisch zu den IFN- γ Effekten wirkt IL-10, das neben IL-4 und IL-5 bei T_H2-Antwort eine Rolle spielt (Mosmann et al., 1990). Dies geschieht über die Inhibition der IL-12- und TNF-Bildung durch aktivierte Makrophagen.

Plasmid-DNA induziert im Organismus eine T_H1-Immunantwort und veranlasst die Produktion der charakteristischen Zytokine (Raz et al., 1996; Shiver et al., 1996). Da Zytokine selten nur von einem Zelltyp synthetisiert werden, untersuchten wir die Wirkung von pC-OVA auf wt-B- und dendritische Zellen, sowie auf die murine Makrophagen-Zelllinie J774 bei einer in vitro Stimulation über 24 Stunden. pC-OVA scheint in der Lage zu sein bei allen genannten Zelltypen eine Zytokinproduktion induzieren zu können (siehe Abb. 12-14). Dabei zeigen sich bei den B-Zellen und den J774 jeweils mit der eingesetzten Plasmidmenge korrelierende Produktionen von IL-6 (Abb. 12A und 13A) und IL-12p40 (Abb. 12B und 13B). Bei den BMD-DCs lassen sich durch Plasmidstimulation ähnlich hohe Mengen an IL-6, IL-12 und TNF α erzeugen wie durch Stimulation mit der einzelsträngigen 1668 CpG-DNA oder LPS (Abb. 14A-C). Die bei B-Zellen (Abb. 12C) und BMD-DCs (Abb. 14D) untersuchte IL-10 Produktion erreichte nach Plasmid- im Vergleich zu LPS- und 1668 CpG-Stimulation nur geringe Werte. Da IL-10 ein wichtiges Zytokin der T_H2-Immunantwort ist, sprechen die niedrigen Spiegel nach pC-OVA-Stimulation dafür, dass durch pDNA

ähnlich wie bei CpG-DNA (Chu et al., 1997; Roman et al., 1997) eine T_{H1} -Verschiebung der Immunantwort erreicht werden kann.

Um die Aktivierung einer Immunantwort zu induzieren ist nicht nur die Wechselwirkung zwischen T-Zell-Rezeptor und präsentiertem Antigen nötig, sondern es bedarf auch kostimulatorischer Moleküle. Eine inadäquate Kostimulation führt zu Anergie (Heeg and Wagner, 1995; Janeway and Bottomly, 1994). Die vermehrte Expression von kostimulatorischen Oberflächenmarkern nach Plasmid-DNA Induktion wurde bereits für DCs beschrieben (Chan et al., 2001).

Verbesserte Stimulations-Effekte nach pDNA-Gabe könnten unter anderem auf einer vermehrten Induktion kostimulatorischer Moleküle auf APCs beruhen. Wir konnten sowohl bei B-Zellen (Abb. 16), als auch bei dendritischen Zellen (Abb. 17) nach vierundzwanzigstündiger Plasmidstimulation eine vermehrte Expression von CD40 und CD86 (B7-2) nachweisen. Allerdings sind zur erhöhten Expression auf B-Zellen bei CD40 (Abb. 16A) höhere stimulierende Plasmidmengen nötig als bei CD86 (Abb. 16B). Die erhöhte Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle auf dendritischen Zellen ist sowohl für CD40, als auch für CD86 vergleichbar mit der nach LPS oder 1668 CpG Stimulation. Deren Expression auf DCs ist weniger dosisabhängig als auf B-Zellen. Diese Ergebnisse gehen einher mit in der Literatur beschriebenen stimulierenden Effekten von CpG-DNA auf die Expression kostimulatorischer Moleküle auf B-Zellen (Davis et al., 1998; Kobayashi et al., 1999; Krieg et al., 1995) und DCs (Asselin-Paturel et al., 2001).

4.3 Vergleich von $TLR9^{-/-}$ und $TLR9^{+/+}$ bezüglich B-Zell-Proliferation, DC-Zytokinproduktion und DC-Oberflächenmarker

Immunstimulatorische einzelsträngige CpG-DNA ist in der Lage die Proliferation muriner B-Zellen zu induzieren, welche TLR9-abhängig ist (Hemmi et al., 2000; Krieg et al., 1995). Daher untersuchten wir in einem Vergleich zwischen $TLR9^{-/-}$ und $TLR9^{+/+}$ -B-Zellen, ob pDNA auf diese mitogen wirkt. Überraschenderweise war die doppelsträngige pDNA nicht in der Lage in vitro mitogen auf murine wt- oder ko-B-Zellen zu wirken (Abb.18). 1668 CpG-DNA stimulierte dagegen im Einklang mit der Literatur TLR9-abhängig das B-Zell-Wachstum. Die LPS-induzierte Proliferation, die TLR4-vermittelt ist, war bei $TLR9$ -ko sowie $TLR9$ -wt B-Zellen identisch. Eine mögliche Erklärung für die verminderte Reaktionsfähigkeit von B-Zellen könnte die Tatsache darstellen, dass B-Zellen doppelsträngige pDNA erheblich weniger effizient mittels Endozytose aufnehmen als ssCpG-DNA. Vereinbar mit dieser Hypothese wurde gezeigt, dass ssCpG-DNA die Proliferation von B-Zellen deutlich stärker

stimuliert als das entsprechende ODN in der doppelsträngigen Version (Zelenay et al., 2003). Wir vermuten daher, dass die strukturellen Unterschiede zwischen dsDNA und ssCpG-DNA die schlechtere B-Zell Stimulation durch Plasmid-DNA durch eine unzureichende zelluläre Aufnahme erklären.

Es ist möglich mit Hilfe von humanem Flt3 Ligand (Flt3L) CD11c-positive DCs (inklusive des IFN- α Subtyps von plasmazytoiden DCs) in vitro aus Knochenmarkzellen zu generieren (Gilliet et al., 2002). Humane pDCs können in der Regel von typischen Typ B CpG-ODNs besser stimuliert werden als von Typ A (Krug et al., 2001; Verthelyi et al., 2001). Dagegen können murine pDCs von beiden Typen TLR9-vermittelt aktiviert werden (Hemmi et al., 2002; Sparwasser et al., 1998).

Beim in vitro Vergleich von wt- und TLR9^{-/-}-DCs bezüglich ihres Ansprechens auf pC-OVA und andere Stimuli beobachteten wir nur bei den Wildtyp-Zellen auf Stimulation von Typ A CpG-2216 und pDNA hin eine IFN- α -Produktion (Abb. 19A). Dabei induzierte das Plasmid eine deutlich geringere Zytokinsynthese. Die ko-DCs zeigten bei keinem Stimulus detektierbare IFN- α Produktion. Eine IL-6-Produktion ließ sich auf alle getesteten TLR-Liganden (Pam3Cys via TLR2, Poly(I:C) via TLR3, LPS via TLR4, R848 via TLR7) hin bei Wildtyp und Knockout zeigen. Die Stimulation von TLR9^{-/-}-DCs mit pDNA und den CpG-ODNs (Abb. 19B) führte zu keiner IL-6-Produktion. Da die TLR9^{-/-}-DCs sich weder zur IFN- α - noch zur IL-6-Produktion durch pC-OVA induzieren ließen folgerten wir, dass Plasmid-DNA wie CpG-DNA (Hemmi et al., 2000) via TLR9 induziert. Auch weitere Zytokinuntersuchungen nach Auftrennung der BMD-DCs in konventionelle und plasmazytoide DCs zeigten auf Plasmid-Stimulation eine IFN- α - sowie IL-6-Synthese durch wt-pDCs. Dabei lagen die Werte der einzelsträngigen 2216 CpG-ODN erneut höher (Daten H. Hochrein, nicht gezeigt). Die pDNA-Induktion führte dagegen bei den konventionellen wt-DCs nur zur IL-6-, nicht aber IFN- α -Produktion. Entsprechend den oben genannten Ergebnissen produzierten die TLR9-gendefizienten pDCs und cDCs auf Plasmid-Stimulation keine Zytokine (Daten H. Hochrein, nicht gezeigt).

Bei der FACs-Analyse der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle nach pDNA-Stimulation der TLR9^{+/+}-wt-DC-Subtypen konnte bei pDCs sowie cDCs eine Induktion von CD25, CD40 und CD86 Expression nachgewiesen werden (Abb. 20A). Auf TLR9-ko DCs konnte nach pC-OVA-Stimulation keine Induktion der Oberflächenexpression beobachtet werden (Abb. 20B). Auch die Induktion kostimulatorischer Moleküle auf DCs (sowohl pDCs als auch cDCs) ist TLR9-abhängig.

4.4 CTL-Induktion durch Plasmid-Stimulation bei TLR9-gendefizienten Mäusen

In der Literatur wurde bereits zahlreich beschrieben, dass Plasmid-Vakzinierung in der Lage ist starke CTL-Reaktionen zu induzieren (Donnelly et al., 1997; Tighe et al., 1998). Dabei ging man davon aus, dass wegen des Adjuvans-Effektes von enthaltenen CpG-Motiven (Sato et al., 1996) auch die Wirkung der pDNA über Toll-like-Rezeptor 9 vermittelt wird.

Auf Grund der oben beschriebenen in vitro Daten erwarteten wir eine eingeschränkte CTL-Induktion bei einer Vakzinierung mit pC-OVA von TLR9-defizienten Mäusen. Überraschenderweise führte jedoch die Plasmid-Immunisierung TLR9^{-/-}-Mäuse zur Induktion peptid-spezifischer Lyse, die von den Werten identisch zu Wildtyp-Milzzellen war (Abb. 21-23). Auch der prozentuale Anteil SIINFEKL-spezifischer CTLs war in TLR9-ko Mäusen nach Vakzinierung gleich dem von wt-Tieren (Abb. 24).

Die Tatsache, dass pC-OVA in vitro dendritische Zellen via TLR9 stimulierte, aber in vivo auch bei TLR9-gendefizienten Mäusen OVA-spezifische CTLs induzierte, warf die Frage nach der Rolle anderer Toll-like-Rezeptoren auf. Um dieser Frage nachzugehen wurden MyD88-knockout-Tiere mit dem zuvor schon verwendeten Immunisierungsprotokoll untersucht. Erneut konnten weder beim Priming, noch bei der klonalen Expansion SIINFEKL-spezifischer CTLs Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden (Spies et al., 2003). Eine Umgehung der TLR9-unabhängigen Signalvermittlung von pDNA in vivo via anderer TLRs [die abgesehen von TLR4 auch ausschließlich via MyD88 vermittelt sind (Alexopoulou et al., 2001; Hacker et al., 2000; Hayashi et al., 2001; Hemmi et al., 2002; Schnare et al., 2000; Takeuchi et al., 2000a; Takeuchi et al., 2000b)] konnte somit ausgeschlossen werden.

Da die bis dato erhobenen Daten sich in den in vivo Experimenten auf zytotoxische Lyse und klonales Wachstum konzentrierten, wäre es für die weitere Aufklärung der in vivo scheinbar TLR9-unabhängigen Plasmid-Vakzinierung von großem Interesse das Ausmaß humoraler Reaktionen bei pDNA-vakzinierten TLR9^{-/-}-Mäusen zu bestimmen.

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Daten, legen den Schluss nahe, dass bei der Plasmid-Vakzinierung bzw. -Stimulation zwischen *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen unterschieden werden muss.

Eine bei *in vitro*-Stimulation nachgewiesene TLR9-Abhängigkeit scheint bei der pDNA-Vakzinierung *in vivo* irrelevant zu sein. Wahrscheinlich erlaubt die stabilere Funktion von Plasmiden *in vivo* (Donnelly et al., 1997) im Gegensatz zur transienten DC-Aktivierung durch CpG-DNA (Akbari et al., 1999) eine längerfristige Antigen-Produktion und so eine TLR9-unabhängige CD4 T_H-Zell- Aktivierung. Dies würde erklären, weshalb das Fehlen von TLR9 bei dem verwendeten Vakzinierungsprotokoll *in vivo* keinen limitierenden Faktor darstellt.

Unbeantwortet durch die bis dato erhobenen Daten bleibt die unterschiedliche Wirkung von pC-OVA auf verschiedene Bereiche der Immunantwort (Proliferation, Zytokine, Oberflächenmarker). Eine genauere Untersuchung von Aufnahme und Prozessierung von pDNA könnte Hinweise hierfür liefern. Zu den entscheidenden Mechanismen dabei würden wahrscheinlich nähere Untersuchungen zur Prozessierung des transkribierten Antigens sowie dessen Präsentation beitragen. Es gilt herauszufinden, ob dies über eine direkte Präsentation durch transfizierte somatische Zellen, die ein Cross-Priming und eine Cross-Präsentation benötigen (Heath and Carbone, 2001), oder durch transfizierte DCs geschieht (Corr et al., 1996; Doe et al., 1996). Obwohl man die immuninduktorische Eigenschaft von Plasmid-DNA inzwischen den CpG-Motiven zuschreibt, kann DNA-Vakzinierung bei MHC-Klasse II-defizienten Mäusen, denen CD4 T_H-Zellen fehlen, keine spezifische zytotoxische Lyse induzieren (Chan et al., 2001; Wild et al., 1999). Anscheinend stellt diese auf MHC II beschränkte T_H-Zell-Aktivität den limitierenden Faktor der pDNA-Vakzinierung dar, da der Adjuvans-Effekt von CpG-Motiven nicht ausreicht CTLs zu primen (Chan et al., 2001). Dazu würde auch unsere Beobachtung passen, dass pC-OVA DCs *in vitro* nur via TLR9 aktivierte, *in vivo* aber auch in TLR9^{-/-} Mäusen stimulierte.

Die TLR9-abhängige Aktivierung von DCs durch pc-OVA im *in vitro* Kurzzeit-Versuch (16-26h, Abb. 19 und 20) stellt die ausschließliche Stimulation von DC dar und berücksichtigt nicht eine CD4-Helferfunktion, wie sie *in vivo* während eines Plasmid-Vakzinierung Langzeitprotokolls (3 Injektionen in 4 Wochen) auftreten könnte. Es ist anzunehmen, dass innerhalb des für wiederholte DNA-Impfung benötigten Zeitrahmens von 3-4 Wochen, MHC Klasse II-beschränkte T-Helfer-Zellen durch Signalwege aktiviert werden, die auf keine CpG-Motiv-TLR9

Wechselwirkungen zurückgehen. Aktivierte T-Helfer-Zellen könnten via CD40-CD40-Ligand-Wechselwirkungen OVA-transfizierte DCs dazu aktivieren zu professionellen APCs zu reifen und somit naive CD8 T-Zellen TLR9-unabhängig zu primen. Untersuchungen in MHC-II defizienten TLR9^{+/+} bzw. TLR9^{-/-} Tieren könnten diese Hypothese bestätigen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde unter Verwendung von Modellplasmiden, die für das Protein Ovalbumin bzw. das Peptid SIINFEKL kodieren, untersucht, ob Plasmid-DNA zur Immunstimulation verschiedener muriner Zellpopulationen (CTL, B-Zellen, dendritische Zellen) in der Lage ist und inwiefern diese einer TLR9-Abhängigkeit unterliegt.

Es konnte mittels *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass pDNA B-Zellen, dendritische Zellen und murine Makrophagen zu Zytokinproduktion und vermehrter Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle induzieren kann. Die Proliferation von B-Zellen ist hingegen nicht durch Plasmid-DNA induzierbar. Plasmid-DNA ist weiterhin an der DC-Aktivierung beteiligt. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Zytokinsynthese, als auch die Expression kostimulatorischer Oberflächenmarker durch pDNA induziert wird. Unter Verwendung von dendritischen Zellen aus TLR9^{-/-} Mäusen konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass die Induktion von Zytokinproduktion, wie auch die Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle TLR9-vermittelt ist.

Bei der *in vivo*-Vakzinierung von Mäusen war die Induktion peptidspezifischer zytotoxischer Lyse überraschenderweise nicht TLR9-vermittelt, da keine Unterschiede zwischen den wt- und ko-Milzzellen festzustellen waren. Eine Umgehung des TLR-9 Signalwegs via anderer TLRs konnte durch MyD88^{-/-} Milzzellen ausgeschlossen werden. Womöglich spielt bei der *in vivo* Langzeit-Immunisierung die Helferfunktion von CD4 T-Zellen eine wichtige Rolle, die TLR9-abhängige Aktivierungsmechanismen des angeborenen Immunsystems bei der Plasmidstimulation umgehen könnte.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten unterstützen die in der gängigen Literatur geäußerte Meinung, dass Plasmid-DNA ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung von Vakzinierung sein kann. Die Daten werfen Fragen nach einer detaillierten Aufklärung der Mechanismen der Signalvermittlung *in vivo* auf, die in CD4-defizienten Versuchstieren vertieft werden könnten.

6 Literaturverzeichnis

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pober, J. S. (2000a). Section IV: Effector Mechanisms of Immune Responses. In *Cellular and Molecular Immunology* (Philadelphia, Pennsylvania 19106, W.B. Saunders Company), pp. 235-269.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pober, J. S. (2000b). Section V: Immunity in Defense and Disease. In *Cellular and Molecular Immunology* (Philadelphia, Pennsylvania 19106, W.B. Saunders Company), pp. 361.

Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M., and Wagner, H. (2002). Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 32, 1958-1968.

Akbari, O., Panjwani, N., Garcia, S., Tascon, R., Lowrie, D., and Stockinger, B. (1999). DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J Exp Med* 189, 169-178.

Akira, S., and Hemmi, H. (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 85, 85-95.

Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675-680.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.

Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P., and Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285, 736-739.

Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O'Garra, A., Biron, C., Briere, F., and Trinchieri, G. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2, 1144-1150.

Ballas, Z. K., Rasmussen, W. L., and Krieg, A. M. (1996). Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 157, 1840-1845.

Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., and Lipford, G. B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9237-9242.

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

Boggs, R. T., McGraw, K., Condon, T., Flournoy, S., Villiet, P., Bennett, C. F., and Monia, B. P. (1997). Characterization and modulation of immune stimulation by modified oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7, 461-471.

- Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., *et al.* (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285, 732-736.
- Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J. L., Di Marco, F., French, L., and Tschopp, J. (1998). MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 273, 12203-12209.
- Cao, Z., Henzel, W. J., and Gao, X. (1996). IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 271, 1128-1131.
- Chan, K., Lee, D. J., Schubert, A., Tang, C. M., Crain, B., Schoenberger, S. P., and Corr, M. (2001). The roles of MHC class II, CD40, and B7 costimulation in CTL induction by plasmid DNA. *J Immunol* 166, 3061-3066.
- Chen, Y., Zhang, J., Moore, S. A., Ballas, Z. K., Portanova, J. P., Krieg, A. M., and Berg, D. J. (2001). CpG DNA induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production. *Int Immunol* 13, 1013-1020.
- Cho, H. J., Takabayashi, K., Cheng, P. M., Nguyen, M. D., Corr, M., Tuck, S., and Raz, E. (2000). Immunostimulatory DNA-based vaccines induce cytotoxic lymphocyte activity by a T-helper cell-independent mechanism. *Nat Biotechnol* 18, 509-514.
- Chu, R. S., Askew, D., Noss, E. H., Tobian, A., Krieg, A. M., and Harding, C. V. (1999). CpG oligodeoxynucleotides down-regulate macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol* 163, 1188-1194.
- Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V., and Harding, C. V. (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 186, 1623-1631.
- Chuang, T., and Ulevitch, R. J. (2001). Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta* 1518, 157-161.
- Corr, M., Lee, D. J., Carson, D. A., and Tighe, H. (1996). Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J Exp Med* 184, 1555-1560.
- Cowdery, J. S., Boerth, N. J., Norian, L. A., Myung, P. S., and Koretzky, G. A. (1999). Differential regulation of the IL-12 p40 promoter and of p40 secretion by CpG DNA and lipopolysaccharide. *J Immunol* 162, 6770-6775.
- Cowdery, J. S., Chace, J. H., Yi, A. K., and Krieg, A. M. (1996). Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol* 156, 4570-4575.
- Davis, H. L. (2000). Use of CpG DNA for enhancing specific immune responses. *Curr Top Microbiol Immunol* 247, 171-183.
- Davis, H. L., Mancini, M., Michel, M. L., and Whalen, R. G. (1996). DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine* 14, 910-915.

- Davis, H. L., Suparto, II, Weeratna, R. R., Jumintarto, Iskandriati, D. D., Chamzah, S. S., Ma'ruf, A. A., Nente, C. C., Pawitri, D. D., Krieg, A. M., *et al.* (2000). CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* *18*, 1920-1924.
- Davis, H. L., Weeratna, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J., Krieg, A. M., and Weeranta, R. (1998). CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* *160*, 870-876.
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* *388*, 548-554.
- Doe, B., Selby, M., Barnett, S., Baenziger, J., and Walker, C. M. (1996). Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 8578-8583.
- Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W., and Liu, M. A. (1997). DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* *15*, 617-648.
- Eaves-Pyles, T., Murthy, K., Liaudet, L., Virag, L., Ross, G., Soriano, F. G., Szabo, C., and Salzman, A. L. (2001). Flagellin, a novel mediator of Salmonella-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. *J Immunol* *166*, 1248-1260.
- Elkins, K. L., Rhinehart-Jones, T. R., Stibitz, S., Conover, J. S., and Klinman, D. M. (1999). Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol* *162*, 2291-2298.
- Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., *et al.* (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* *413*, 78-83.
- Fuller, D. H., Murphey-Corb, M., Clements, J., Barnett, S., and Haynes, J. R. (1996). Induction of immunodeficiency virus-specific immune responses in rhesus monkeys following gene gun-mediated DNA vaccination. *J Med Primatol* *25*, 236-241.
- Fynan, E. F., Webster, R. G., Fuller, D. H., Haynes, J. R., Santoro, J. C., and Robinson, H. L. (1993). DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 11478-11482.
- Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., and Madara, J. L. (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* *167*, 1882-1885.
- Gilliet, M., Boonstra, A., Paturel, C., Antonenko, S., Xu, X. L., Trinchieri, G., O'Garra, A., and Liu, Y. J. (2002). The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* *195*, 953-958.

- Gomis, S., Babiuk, L., Godson, D. L., Allan, B., Thrush, T., Townsend, H., Willson, P., Waters, E., Hecker, R., and Potter, A. (2003). Protection of chickens against *Escherichia coli* infections by DNA containing CpG motifs. *Infect Immun* *71*, 857-863.
- Gramzinski, R. A., Doolan, D. L., Sedegah, M., Davis, H. L., Krieg, A. M., and Hoffman, S. L. (2001). Interleukin-12- and gamma interferon-dependent protection against malaria conferred by CpG oligodeoxynucleotide in mice. *Infect Immun* *69*, 1643-1649.
- Gregoriadis, G., Saffie, R., and Hart, S. L. (1996). High yield incorporation of plasmid DNA within liposomes: effect on DNA integrity and transfection efficiency. *J Drug Target* *3*, 469-475.
- Gurunathan, S., Klinman, D. M., and Seder, R. A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol* *18*, 927-974.
- Hacker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Lipford, G. B., and Wagner, H. (1998). CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *Embo J* *17*, 6230-6240.
- Hacker, H., Vabulas, R. M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., and Wagner, H. (2000). Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* *192*, 595-600.
- Harandi, A. M., Eriksson, K., and Holmgren, J. (2003). A protective role of locally administered immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in a mouse model of genital herpes infection. *J Virol* *77*, 953-962.
- Hartmann, G., Weeratna, R. D., Ballas, Z. K., Payette, P., Blackwell, S., Suparto, I., Rasmussen, W. L., Waldschmidt, M., Sajuthi, D., Purcell, R. H., *et al.* (2000). Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* *164*, 1617-1624.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., and Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* *52*, 269-279.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* *410*, 1099-1103.
- Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* *19*, 47-64.
- Heeg, K., and Wagner, H. (1995). Induction of responsiveness in superantigen-induced anergic T cells. Role of ligand density and costimulatory signals. *J Immunol* *155*, 83-92.
- Heit, A., Maurer, T., Hochrein, H., Bauer, S., Huster, K. M., Busch, D. H., and Wagner, H. (2003). Cutting edge: Toll-like receptor 9 expression is not required for CpG DNA-aided cross-presentation of DNA-conjugated antigens but essential for cross-priming of CD8 T cells. *J Immunol* *170*, 2802-2805.

- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3, 196-200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- Hochrein, H., O'Keeffe, M., and Wagner, H. (2002). Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 63, 1103-1110.
- Horner, A. A., Ronaghy, A., Cheng, P. M., Nguyen, M. D., Cho, H. J., Broide, D., and Raz, E. (1998). Immunostimulatory DNA is a potent mucosal adjuvant. *Cell Immunol* 190, 77-82.
- Hornig, T., Barton, G. M., and Medzhitov, R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2, 835-841.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168, 4531-4537.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162, 3749-3752.
- Iho, S., Yamamoto, T., Takahashi, T., and Yamamoto, S. (1999). Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cells to induce IFN-gamma production in vitro. *J Immunol* 163, 3642-3652.
- Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., Ozaki, Y., Tomizawa, H., Akira, S., and Fukuhara, S. (2002). Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 195, 1507-1512.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13.
- Janeway, C. A., Jr., and Bottomly, K. (1994). Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 76, 275-285.
- Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (1998). Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 10, 349-350.
- Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31, 3388-3393.
- Jones, T. R., Obaldia, N., 3rd, Gramzinski, R. A., Charoenvit, Y., Kolodny, N., Kitov, S., Davis, H. L., Krieg, A. M., and Hoffman, S. L. (1999). Synthetic oligodeoxynucleotides con-

taining CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys. *Vaccine* *17*, 3065-3071.

Kadowaki, N., Antonenko, S., and Liu, Y. J. (2001a). Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. *J Immunol* *166*, 2291-2295.

Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F., and Liu, Y. J. (2001b). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* *194*, 863-869.

Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K., and Akira, S. (2001). Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* *166*, 5688-5694.

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* *11*, 115-122.

Kawasaki, K., Akashi, S., Shimazu, R., Yoshida, T., Miyake, K., and Nishijima, M. (2000). Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem* *275*, 2251-2254.

Kim, S. K., Ragupathi, G., Cappello, S., Kagan, E., and Livingston, P. O. (2000). Effect of immunological adjuvant combinations on the antibody and T-cell response to vaccination with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugates. *Vaccine* *19*, 530-537.

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

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

Klinman, D. M., Barnhart, K. M., and Conover, J. (1999a). CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine* *17*, 19-25.

Klinman, D. M., Verthelyi, D., Takeshita, F., and Ishii, K. J. (1999b). Immune recognition of foreign DNA: a cure for bioterrorism? *Immunity* *11*, 123-129.

Klinman, D. M., Yamshchikov, G., and Ishigatsubo, Y. (1997). Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J Immunol* *158*, 3635-3639.

Kobayashi, H., Horner, A. A., Takabayashi, K., Nguyen, M. D., Huang, E., Cinman, N., and Raz, E. (1999). Immunostimulatory DNA pre-priming: a novel approach for prolonged Th1-biased immunity. *Cell Immunol* *198*, 69-75.

Kopp, E., Medzhitov, R., Carothers, J., Xiao, C., Douglas, I., Janeway, C. A., and Ghosh, S. (1999). ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev* *13*, 2059-2071.

Krieg, A. M. (2001). Now I know my CpGs. *Trends Microbiol* *9*, 249-252.

- Krieg, A. M. (2002a). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20, 709-760.
- Krieg, A. M. (2002b). From A to Z on CpG. *Trends Immunol* 23, 64-65.
- Krieg, A. M., Love-Homan, L., Yi, A. K., and Harty, J. T. (1998). CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* 161, 2428-2434.
- Krieg, A. M., Matson, S., and Fisher, E. (1996). Oligodeoxynucleotide modifications determine the magnitude of B cell stimulation by CpG motifs. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6, 133-139.
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., and Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549.
- Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z. K., Endres, S., Krieg, A. M., and Hartmann, G. (2001a). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α / β in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31, 2154-2163.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A. M., and Hartmann, G. (2001b). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 31, 3026-3037.
- Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J., and Finberg, R. W. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1, 398-401.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Lim, S. K. (2003). Freund adjuvant induces TLR2 but not TLR4 expression in the liver of mice. *Int Immunopharmacol* 3, 115-118.
- Lipford, G. B., Bauer, M., Blank, C., Reiter, R., Wagner, H., and Heeg, K. (1997). CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol* 27, 2340-2344.
- Lipford, G. B., Bendigs, S., Heeg, K., and Wagner, H. (2000a). Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines. *Immunology* 101, 46-52.
- Lipford, G. B., Sparwasser, T., Zimmermann, S., Heeg, K., and Wagner, H. (2000b). CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses. *J Immunol* 165, 1228-1235.

- McCluskie, M. J., and Davis, H. L. (1998). CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *J Immunol* *161*, 4463-4466.
- Means, T. K., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D. T., and Fenton, M. J. (1999). Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* *163*, 3920-3927.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* *9*, 4-9.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C. A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* *2*, 253-258.
- Meek, R. L., Walsh, K. A., and Palmiter, R. D. (1982). The signal sequence of ovalbumin is located near the NH₂ terminus. *J Biol Chem* *257*, 12245-12251.
- Michalek, M. T., Benacerraf, B., and Rock, K. L. (1992). The class II MHC-restricted presentation of endogenously synthesized ovalbumin displays clonal variation, requires endosomal/lysosomal processing, and is up-regulated by heat shock. *J Immunol* *148*, 1016-1024.
- Miller, R. L., Gerster, J. F., Owens, M. L., Slade, H. B., and Tomai, M. A. (1999). Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol* *21*, 1-14.
- Mosmann, T. R., Schumacher, J. H., Fiorentino, D. F., Leverah, J., Moore, K. W., and Bond, M. W. (1990). Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-5, IL-6, and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoassay. *J Immunol* *145*, 2938-2945.
- Mustafa, F., Richmond, J. F., Fernandez-Larsson, R., Lu, S., Fredriksson, R., Fenyo, E. M., O'Connell, M., Johnson, E., Weng, J., Santoro, J. C., and Robinson, H. L. (1997). HIV-1 Env glycoproteins from two series of primary isolates: replication phenotype and immunogenicity. *Virology* *229*, 269-278.
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Rucio, L. P., Allavena, P., and Mantovani, A. (2000). Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* *164*, 5998-6004.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P., and Dixit, V. M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* *278*, 1612-1615.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S., and Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* *164*, 558-561.

- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., Young, D. W., Ishizaka, S. T., Rose, J., Chow, J. C., and Strauss, J. F., 3rd (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276, 10229-10233.
- Olbrich, A. R., Schimmer, S., Heeg, K., Schepers, K., Schumacher, T. N., and Dittmer, U. (2002). Effective postexposure treatment of retrovirus-induced disease with immunostimulatory DNA containing CpG motifs. *J Virol* 76, 11397-11404.
- Opitz, B., Schroder, N. W., Spreitzer, I., Michelsen, K. S., Kirschning, C. J., Hallatschek, W., Zahringer, U., Hartung, T., Gobel, U. B., and Schumann, R. R. (2001). Toll-like receptor-2 mediates *Treponema glycolipid* and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem* 276, 22041-22047.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13766-13771.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282, 2085-2088.
- Pyles, R. B., Higgins, D., Chalk, C., Zalar, A., Eiden, J., Brown, C., Van Nest, G., and Stanberry, L. R. (2002). Use of immunostimulatory sequence-containing oligonucleotides as topical therapy for genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Virol* 76, 11387-11396.
- Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P., and Malo, D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (*Tlr4*). *J Exp Med* 189, 615-625.
- Ramachandra, L., Chu, R. S., Askew, D., Noss, E. H., Canaday, D. H., Potter, N. S., Johnsen, A., Krieg, A. M., Nedrud, J. G., Boom, W. H., and Harding, C. V. (1999). Phagocytic antigen processing and effects of microbial products on antigen processing and T-cell responses. *Immunol Rev* 168, 217-239.
- Raz, E., Carson, D. A., Parker, S. E., Parr, T. B., Abai, A. M., Aichinger, G., Gromkowski, S. H., Singh, M., Lew, D., Yankauckas, M. A., and *et al.* (1994). Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9519-9523.
- Raz, E., Tighe, H., Sato, Y., Corr, M., Dudler, J. A., Roman, M., Swain, S. L., Spiegelberg, H. L., and Carson, D. A. (1996). Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5141-5145.
- Redford, T. W., Yi, A. K., Ward, C. T., and Krieg, A. M. (1998). Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 161, 3930-3935.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., and Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 588-593.

Roman, M., Martin-Orozco, E., Goodman, J. S., Nguyen, M. D., Sato, Y., Ronaghy, A., Kornbluth, R. S., Richman, D. D., Carson, D. A., and Raz, E. (1997). Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med* 3, 849-854.

Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M. D., Silverman, G. J., Lotz, M., Carson, D. A., and Raz, E. (1996). Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273, 352-354.

Schirmbeck, R., and Reimann, J. (2001). Revealing the potential of DNA-based vaccination: lessons learned from the hepatitis B virus surface antigen. *Biol Chem* 382, 543-552.

Schnare, M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S., and Medzhitov, R. (2000). Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* 10, 1139-1142.

Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., and Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274, 17406-17409.

Sedegah, M., Finkelman, F., and Hoffman, S. L. (1994). Interleukin 12 induction of interferon gamma-dependent protection against malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10700-10702.

Sena-Esteves, M., Saeki, Y., Camp, S. M., Chiocca, E. A., and Breakefield, X. O. (1999). Single-step conversion of cells to retrovirus vector producers with herpes simplex virus-Epstein-Barr virus hybrid amplicons. *J Virol* 73, 10426-10439.

Sester, D. P., Naik, S., Beasley, S. J., Hume, D. A., and Stacey, K. J. (2000). Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA. *J Immunol* 165, 4165-4173.

Sethi, S., Lipford, G., Wagner, H., and Kretzschmar, H. (2002). Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet* 360, 229-230.

Shimada, S., Yano, O., and Tokunaga, T. (1986). In vivo augmentation of natural killer cell activity with a deoxyribonucleic acid fraction of BCG. *Jpn J Cancer Res* 77, 808-816.

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189, 1777-1782.

Shirakabe, K., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Matsuda, S., Moriguchi, T., Gotoh, Y., Matsumoto, K., and Nishida, E. (1997). TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 272, 8141-8144.

Shirota, H., Sano, K., Hirasawa, N., Terui, T., Ohuchi, K., Hattori, T., Shirato, K., and Tamura, G. (2001). Novel roles of CpG oligodeoxynucleotides as a leader for the sampling and presentation of CpG-tagged antigen by dendritic cells. *J Immunol* 167, 66-74.

Shirota, H., Sano, K., Kikuchi, T., Tamura, G., and Shirato, K. (2000). Regulation of murine airway eosinophilia and Th2 cells by antigen-conjugated CpG oligodeoxynucleotides as a novel antigen-specific immunomodulator. *J Immunol* 164, 5575-5582.

- Shiver, J. W., Davies, M. E., Perry, H. C., Freed, D. C., and Liu, M. A. (1996). Humoral and cellular immunities elicited by HIV-1 vaccination. *J Pharm Sci* 85, 1317-1324.
- Shoham, S., Huang, C., Chen, J. M., Golenbock, D. T., and Levitz, S. M. (2001). Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol* 166, 4620-4626.
- Sparwasser, T., Koch, E. S., Vabulas, R. M., Heeg, K., Lipford, G. B., Ellwart, J. W., and Wagner, H. (1998). Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 28, 2045-2054.
- Sparwasser, T., Vabulas, R. M., Villmow, B., Lipford, G. B., and Wagner, H. (2000). Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur J Immunol* 30, 3591-3597.
- Spies, B., Hochrein, H., Vabulas, M., Huster, K., Busch, D. H., Schmitz, F., Heit, A., and Wagner, H. (2003). Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice. *J Immunol* 171, 5908-5912.
- Stacey, K. J., Sweet, M. J., and Hume, D. A. (1996). Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* 157, 2116-2122.
- Steiner, T. S., Nataro, J. P., Poteet-Smith, C. E., Smith, J. A., and Guerrant, R. L. (2000). Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 105, 1769-1777.
- Sun, S., Kishimoto, H., and Sprent, J. (1998a). DNA as an adjuvant: capacity of insect DNA and synthetic oligodeoxynucleotides to augment T cell responses to specific antigen. *J Exp Med* 187, 1145-1150.
- Sun, S., Zhang, X., Tough, D. F., and Sprent, J. (1998b). Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *J Exp Med* 188, 2335-2342.
- Sur, S., Wild, J. S., Choudhury, B. K., Sur, N., Alam, R., and Klinman, D. M. (1999). Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 162, 6284-6293.
- Sweet, M. J., Stacey, K. J., Kakuda, D. K., Markovich, D., and Hume, D. A. (1998). IFN-gamma primes macrophage responses to bacterial DNA. *J Interferon Cytokine Res* 18, 263-271.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999a). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443-451.
- Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P. F., and Akira, S. (2000a). Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164, 554-557.

- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* *13*, 933-940.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Takeda, K., and Akira, S. (1999b). TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* *231*, 59-65.
- Takeuchi, O., Takeda, K., Hoshino, K., Adachi, O., Ogawa, T., and Akira, S. (2000b). Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* *12*, 113-117.
- Tang, D. C., DeVit, M., and Johnston, S. A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* *356*, 152-154.
- Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J. A., and Imler, J. L. (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 10520-10525.
- Tighe, H., Corr, M., Roman, M., and Raz, E. (1998). Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunol Today* *19*, 89-97.
- Tighe, H., Takabayashi, K., Schwartz, D., Marsden, R., Beck, L., Corbeil, J., Richman, D. D., Eiden, J. J., Jr., Spiegelberg, H. L., and Raz, E. (2000). Conjugation of protein to immunostimulatory DNA results in a rapid, long-lasting and potent induction of cell-mediated and humoral immunity. *Eur J Immunol* *30*, 1939-1947.
- Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T., and et al. (1984). Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* *72*, 955-962.
- Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* *13*, 251-276.
- Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dworki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Friedman, A., and et al. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* *259*, 1745-1749.
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., and Aderem, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* *401*, 811-815.
- Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C. J., Hacker, H., and Wagner, H. (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* *276*, 31332-31339.

- Vabulas, R. M., Pircher, H., Lipford, G. B., Hacker, H., and Wagner, H. (2000). CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 164, 2372-2378.
- Vallin, H., Perers, A., Alm, G. V., and Ronnblom, L. (1999). Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN- α inducer in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 163, 6306-6313.
- Verthelyi, D., Ishii, K. J., Gursel, M., Takeshita, F., and Klinman, D. M. (2001). Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol* 166, 2372-2377.
- Wagner, H. (1999). Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* 73, 329-368.
- Werts, C., Tapping, R. I., Mathison, J. C., Chuang, T. H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D. A., Godowski, P. J., Hayashi, F., Ozinsky, A., *et al.* (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2, 346-352.
- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., and Cao, Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7, 837-847.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., and Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78, 1101-1115.
- Wild, J., Grusby, M. J., Schirmbeck, R., and Reimann, J. (1999). Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent. *J Immunol* 163, 1880-1887.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465-1468.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431-1433.
- Wright, S. D., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Ramos, R. A. (1989). Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J Exp Med* 170, 1231-1241.
- Yamamoto, S., Kuramoto, E., Shimada, S., and Tokunaga, T. (1988). In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon- α / β and - γ with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn J Cancer Res* 79, 866-873.
- Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O., and Tokunaga, T. (1992). Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol* 148, 4072-4076.

Yamamoto, T., Yamamoto, S., Kataoka, T., Komuro, K., Kohase, M., and Tokunaga, T. (1994a). Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Jpn J Cancer Res* 85, 775-779.

Yamamoto, T., Yamamoto, S., Kataoka, T., and Tokunaga, T. (1994b). Ability of oligonucleotides with certain palindromes to induce interferon production and augment natural killer cell activity is associated with their base length. *Antisense Res Dev* 4, 119-122.

Yi, A. K., Chace, J. H., Cowdery, J. S., and Krieg, A. M. (1996a). IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 156, 558-564.

Yi, A. K., Klinman, D. M., Martin, T. L., Matson, S., and Krieg, A. M. (1996b). Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J Immunol* 157, 5394-5402.

Zelenay, S., Elias, F., and Flo, J. (2003). Immunostimulatory effects of plasmid DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol* 33, 1382-1392.

Zimmermann, S., Egeter, O., Hausmann, S., Lipford, G. B., Rocken, M., Wagner, H., and Heeg, K. (1998). CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 160, 3627-3630.

Persönliche Daten

Name: **Barbara Elisabeth Blank, geb. Spies**
Geburtsdatum/-ort: 24.Juni 1979 in Regensburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet mit Dr. med. Christian Blank
Konfession: römisch katholisch
Eltern: Konrad Spies, Bankdirektor a.D. und Paula Spies, Bankkauffrau
Geschwister: Dr. med. Marcus Spies und Dipl. Kfm. Florian Spies

Ausbildung

1985 - 1989 Grundschule Bad Abbach
1989 - 1998 Albertus-Magnus-Gymnasium, Regensburg (humanistisch-neusprachlich)
06/1998 Abitur am Albertus-Magnus-Gymnasium
 Abiturfächer: Biologie, Französisch, Mathematik und kath. Religion
1998 - 2000 Studium der Humanmedizin (vorklinischer Abschnitt) an der Universität
 Regensburg
09/2000 Ärztliche Vorprüfung
2000 - 2003 Studium der Humanmedizin (klinischer Abschnitt) an der TU München
09/2001 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2003 - 2005 Studium der Humanmedizin (klinischer Abschnitt), Universität
 Regensburg
09/2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
9/2003-3/2004 Fertigstellung Doktorarbeit
2004 - 2005 Praktisches Jahr an der Universität Regensburg/ University of San Diego
04 – 05/2004 Stipendium der Uni Regensburg an der University of California San
 Diego, USA
 Hämatologie/ Onkologie, Veterans Affairs Hospital, San Diego
 Gastroenterologie, Veterans Affairs Hospital, San Diego

Curriculum vitae

06-07/2004	Innere Medizin II, Kardiologie an der Universität Regensburg
07-08/2004	Innere Medizin I, Gastroenterologie an der Universität Regensburg
08-11/2004	Klinik für Neurologie der Universität Regensburg
09/2004 – 03/2005	Klinik für Chirurgie der Universität Regensburg
04/2005	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
seit 07/2005	Assistenzärztin in der Abteilung Chirurgie 2 (Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Sportmedizin) Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg

Famulaturen

März 2001	Hals- Nasen- Ohren- Heilkunde, Dr. E. Gahleitner, Regensburg
Sept. 2001	Diagnost. Radiologie, Mercy Hospital & Medical Center, Chicago, IL, USA
März 2002	Augenheilkunde am Klinikum Rechts der Isar der TU München
Aug. 2002	Kinderheilkunde an der Klinik St. Hedwig, Regensburg

Promotion

Oktober 2001 – März 2004	Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene Leiter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hermann Wagner Ph.D. (Melbourne) Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hermann Wagner Ph.D. (Melbourne) Thema: Zur Rolle von Toll-like-Rezeptoren bei der Immunisierung mit nackter DNA
-----------------------------	--

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Zur Rolle von Toll-like-Rezeptoren bei der Immunisierung mit nackter DNA
am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen
Universität München

unter der Anleitung und Betreuung durch

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner, Ph.D. (Melbourne)

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

- (X) Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.
- (X) Die vollständige Dissertation wurde in The Journal of Immunology, 2003, 171: 5908-5912 veröffentlicht. Die Fakultät für Medizin hat der Vorveröffentlichung zugestimmt.
- (X) Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.
- () Ich habe bereits am bei der Fakultät für der Hochschule unter Vorlage einer Dissertation mit dem Thema die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis:

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den 10.05.2005