

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr., Dr. h.c. H. Wagner, Ph. D. (Melbourne))

# Effekte von CpG-Oligodesoxynukleotiden im Mausmodell auf die ungestörte Hämatopoese, und auf eine durch Chemotherapie verursachte Suppression

Norbert Heinrich

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. J. G. Duyster

Die Dissertation wurde am 19.10.2005 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.02.2006 angenommen.

## Abkürzungen:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
APZ	Antigen präsentierende Zelle/ Zellen
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Oberflächenantigen (cluster of differentiation antigene)
CpG	5'-Cytosin-Phosphat-Guanosin-3'
CFU	Kolonie-bildende Einheit (colony forming unit)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle/ Zellen
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsorter
FITC	Fluoreszeinisothiocyant
FKS	fötales Kälberserum
FS	Vorwärtsstreuung (Forward Scatter)
G-CSF	Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen- Koloniestimulierender Faktor
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP	intraperitoneale Injektion
KM	Knochenmark

LPS	Lipopolysaccharid
NF-κB	Nuklearer Faktor κ - B
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
PAMP	Pathogen assoziierte molekulare Muster ( pathogen-associated molecular patterns)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMN	polymorphonukleärer Granulozyt, auch neutrophiler Granulozyt
PRR	Rezeptor, der PAMP erkennt (pattern recognition receptor)
SS	Seitwärtsstreuung (sideward scatter)
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TZR	T-Zellrezeptor
ZTL	zytotoxischer T-Lymphozyt

1. Einleitung .....	6
1.1. Das Immunsystem.....	6
1.1.1. Das angeborene Immunsystem.....	7
1.1.2. Regulation der Zellproduktion im Knochenmark.....	9
1.1.3. Das adaptive Immunsystem.....	10
1.2. Immunsuppression nach Chemotherapie .....	11
1.2.1. Angeborenes Immunsystem .....	11
1.2.2. Adaptives Immunsystem .....	11
1.2.3. Bisher angewandte Therapiestrategien.....	12
1.3. Wirkungsweise von CpG-ODN .....	13
1.3.1. Wirkung auf die Hämatopoese .....	14
1.3.2. Wirkung auf Zellen des innaten Immunsystems .....	14
1.3.3. Wirkung auf Zellen des adaptiven Immunsystems.....	15
2. Fragestellung .....	16
3. Material und Methoden .....	17
3.1. Mäuse.....	17
3.2. Behandlung, Injektionen.....	17
3.2.1. 5-Fluorouracil .....	17
3.2.2. CpG ODN.....	17
3.3. Organentnahme und Analysemethoden .....	18
3.3.1. Blutabnahme und Differentialzählung.....	18
3.3.2. Peritonealzellen .....	18
3.3.3. Knochenmarkshistologie .....	18
3.3.4. Präparation von Knochenmarkszellen .....	19
3.3.5. Knochenmarkszellkultur.....	19
3.3.6. Analyse von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie (FACS).....	20
3.4. Statistik .....	22
4. Ergebnisse .....	23
4.1. Analyse der nach CPG-ODN-Injektion eingewanderten Peritoneal-zellen.....	23
4.1.1. Granulozyten .....	23
4.1.2. Dendritische Zellen.....	23
4.2. Veränderungen im Blutbild nach Injektion von CpG ODN .....	25
4.3. Histologische Veränderungen im Knochenmark .....	27

4.3.1. Erythropoese .....	27
4.3.2. Granulopoese .....	28
4.4. Durchflusszytometrisch fassbare Veränderungen im Knochenmark .....	30
4.4.1 Gesamtzellularität .....	30
4.4.2 Erythropoese .....	30
4.4.3 Granulopoese .....	30
4.4.4. Dendritische Zellen.....	31
4.5. Ergebnisse der Knochenmarkszellkultur .....	32
4.5.1. PMN.....	33
4.5.2. Dendritische Zellen.....	33
4.6. Einfluss von CpG ODN im Chemotherapiemodell .....	34
4.6.1. PMN.....	34
4.6.3 Thrombozyten.....	34
5. Diskussion .....	37
6. Zusammenfassung .....	44
7. Literatur .....	45

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

Der menschliche Körper wird während seines Lebens von Mikroorganismen, wie Viren, Bakterien und eukaryontischen Parasiten bedroht, die Krankheit und Tod verursachen können. Die Abwehr dieser Organismen erfolgt in erster Linie durch die schützende Barriere von Haut und Schleimhäuten (Janeway, Travers 1997; Walker 1985). Gelingt einem Krankheitserreger die Penetration dieser Barriere, ist es die Aufgabe des Immunsystems, den Fremdkörper zu vernichten oder zumindest abzukapseln und seine schädigende Wirkung auf den Organismus zu neutralisieren.

Zu diesem Zweck hat sich im Laufe der Evolution neben den Fresszellen oder Phagozyten, die man dem angeborenen oder unspezifischen Immunsystem zuordnet, auch ein System des spezifischen Erkennens von fremden, mithin gefährlichen, Organismen, entwickelt. Dieses nimmt Teil an deren Bekämpfung und bildet das sogenannte immunologische Gedächtnis.

Das angeborene Immunsystem umfasst neben den Granulozyten und Makrophagen, den Phagozyten, noch humorale Bestandteile wie das Komplementsystem und Lysozym. Das spezifische oder adaptive Immunsystem besteht aus T-Lymphozyten, deren Funktion unter anderem die Steuerung der Antikörperproduktion und die Abtötung virusinfizierter Zellen ist, sowie den B-Lymphozyten, die Antikörper produzieren. Das adaptive Immunsystem besitzt die Fähigkeit zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses, d.h. einmal erkannte Pathogene werden bei späterer Neuinfektion durch spezielle Gedächtnis-Lymphozyten wiedererkannt und mit bedeutend schnellerer Reaktion bekämpft (Janeway, Travers 1997; Schiemann, Busch 2003).

Das angeborene und das adaptive Immunsystem arbeiten synergistisch bei der Bekämpfung von Krankheitserregern. So präsentieren Zellen des angeborenen Immunsystems (sogenannte Antigen-Präsentierende Zellen, APZ) Proteine aus phagozytierten Keimen, und je nach Aktivierungsgrad zusätzlich kostimulatorische Moleküle, deren Vorhandensein die Aktivierung von Lymphozyten erst ermöglicht (Janeway, Travers 1997; Gimmi, Freeman 1991).

Umgekehrt sind Makrophagen als Zellen des innaten Immunsystems nicht in der Lage, beispielsweise phagozytierte Tuberkelerreger (*Mycobacterium tuberculosis*) abzutöten, und bedürfen dazu erst der Aktivierung durch spezifische T-Zellen (Brookes, Pathan 2003).

### **1.1.1. Das angeborene Immunsystem**

#### **1.1.1.1. Neutrophile Granulozyten**

Dieser Teil des Immunsystems ist hauptsächlich für die schnelle Antwort auf eine Infektion zuständig. Zum größten Teil wird diese durch neutrophile, oder polymorphonukleäre Granulozyten (PMN) ausgeführt, die den größten Anteil der Fresszellen oder Phagozyten darstellen (Junqueira, Carneiro 1995). Sie entstehen im Knochenmark aus myeloischen Stammzellen, die in mehreren Schritten zu stabkernigen und schließlich zu segmentkernigen, reifen Granulozyten differenzieren. Wenn diese Zellen reif sind, verlassen sie das Knochenmark und zirkulieren mit dem Blutstrom (Smeaton 1984). Nach kurzer Zeit der Zirkulation wandern sie ins Gewebe aus, wo sie nach wenigen Tagen durch Apoptose (programmierten Zelltod) sterben. Dieser programmierte Zelltod wird allerdings im Falle einer Entzündungsreaktion verzögert, wenn erhöhter Bedarf an diesem Zelltyp besteht (Watson, Rotstein 1997).

PMN besitzen zahlreiche Rezeptoren, die Molekülstrukturen erkennen, die für Krankheitserreger spezifisch sind (Pathogen associated molecular patterns, PAMP). Beispielsweise können sie durch den Oberflächenrezeptor CD14 und die Toll-like Rezeptoren (TLR) 4 und 2 bakterielles Lipopolysaccharid erkennen (Henneke, Osmers 2003; Girard, Pedron 2003), sowie bakterielle Lipoteichonsäure (Takeuchi, Hoshino 1999). Diese Rezeptoren werden unter „pattern recognition receptor (PRR)“ zusammengefasst. Außerdem weisen sie sogenannte Fc-Rezeptoren auf, die Antikörper erkennen, die an ihr spezifisches Antigen gebunden haben (Worku, Paape 1994).

Im Falle einer Phagozytose (Aufnahme) eines Pathogens durch PMN, Makrophagen oder dendritische Zellen (s.u.), wird das Pathogen im Phagolysosom (dem bei Phagozytose gebildeten Vesikel) durch reaktive Sauerstoffradikale, die die Zelle bildet, abgetötet, und durch verschiedene Enzyme abgebaut. In der Wand dieses Vesikels befinden sich die erwähnten, zum Teil den Toll-Rezeptoren von *Drosophila* verwandten Moleküle (Toll-like Rezeptoren, TLR), die der Erkennung von PAMP dienen und eine Aktivierung des Phagozyten bewirken (Hemmi, Takeuchi 2000; Takeshita, Takeshita 2000; Sparwasser, Vabulas 2000). Darauf folgt eine Sekretion von interzellulären Eiweißbotenstoffen, den sogenannten Zytokinen, die zahlreiche aktivierende

Funktionen auf das Immunsystem ausüben. Besonders hervorzuheben ist in diesem Kontext der Toll-like Rezeptor 9 (TLR9), der DNA mit einem unmethylierten Motiv von 5'-Purin-Purin-Cytosin-Guanosin-Pyrimidin-Pyrimidin-3' (CpG) erkennt (Wagner 2002). Bei Rezeptoraktivierung reagieren diese Zellen mit Aktivierung und Erhöhung der Produktion von aggressiven Sauerstoffradikalen, die zur Keimabtötung dienen (Lotz, Aga 2004).

Die Hauptfunktion der PMN ist die Phagozytose und Abtötung von Krankheitserregern, die durch die Oberflächenrezeptoren erkannt werden. Interessanterweise findet sich eine Einwanderung von PMN am Ort einer Injektion mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS, einem klassischen PAMP) in experimentellen Situationen erst später als 24 Stunden nach Infektion (Haziot, Hijiya 2001). Diese Verzögerung ist offenbar abhängig von TLR4, und wird bei TLR4 defizienten Mäusen nicht beobachtet.

#### **1.1.1.2. Makrophagen**

Makrophagen sind Phagozyten, die in vielen verschiedenen Geweben anzutreffen sind, und wie die PMN aus dem Knochenmark stammen. Nach der Differenzierung verlassen die Monozyten als Vorläuferform das Knochenmark, wandern in die Peripherie und differenzieren dort zu Makrophagen (Junqueira, Carneiro 1995). Ihre Hauptaufgabe ist neben der Erkennung und Phagozytose von Krankheitserregern die Phagozytose von abgestorbenen Zellen und anderem Detritus. Wie die neutrophilen Granulozyten besitzen sie zahlreiche Rezeptoren wie TLR2 und TLR4, die der Erkennung von PAMP dienen (Janeway, Travers 1997; Takeuchi, Hoshino 1999).

#### **1.1.1.3. Dendritische Zellen**

Eines der Bindeglieder zwischen unspezifischem und adaptivem Immunsystem stellen die dendritischen Zellen (DZ) dar. Zum Teil stammen sie von lymphoiden Vorläuferzellen ab, der größere Anteil entstammt jedoch der myeloischen Reihe der Blutbildung, der auch Granulozyten und Makrophagen zuzurechnen sind (Steinman 2003). Ihre Funktion ist die Phagozytose von Antigen aus ihrer Umgebung, und Präsentation von Peptiden auf speziellen Molekülen (Janeway, Travers 1997). Dabei phagozytieren sie sowohl körpereigenes Material von abgestorbenem Gewebe, als auch Fremdkörper.

Die der Präsentation dienenden Moleküle werden als Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) bezeichnet. Man unterscheidet MHC Klasse I- von Klasse

II- Molekülen. MHC I findet sich mit Ausnahme von Erythrozyten auf der Oberfläche aller Zellen des menschlichen Körpers und dient der Präsentation von Peptiden, die beim Abbau von zelleigenen Proteinen entstehen, oder von intrazellulären Pathogenen stammen (Janeway, Travers 1997).

Durch die Präsentation von Fremdpeptiden und ermöglicht dieses System die Erkennung und Abtötung von virusinfizierten Zellen durch spezifische zytotoxische T-Lymphozyten, die CD8 als Oberflächenmerkmal tragen.

MHC II- Moleküle kommen nur auf den sogenannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen vor, auf Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen, dienen zur Präsentation phagozytierten Materials und damit der Erkennung durch spezifische, CD4 tragende T-Lymphozyten.

Nach Aktivierung können DZ beispielsweise die Zytokine Interleukin (IL)-1, IL-6, Koloniestimulierender Faktor Granulozyten-Makrophagen (GM-CSF), IL-12, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- $\alpha$  und Interferon Typ I produzieren und freisetzen (Kalupahana, Emilianus 2003; Hemmi, Kaisho 2003).

Auch die Wanderungskinetik der dendritischen Zellen ist von einem entzündlichen Stimulus abhängig. In experimentellen Infektionen gelang es, einen Influx von dendritischen Zellen auszulösen, sowie die dafür offenbar maßgeblichen Chemokinrezeptoren auf den Zellen zu identifizieren (Umemoto, Brokaw 2002; Stumbles, Strickland 2001).

### **1.1.2. Regulation der Zellproduktion im Knochenmark**

Da die Lebensdauer von DCs, Makrophagen und PMN begrenzt ist, muss im Knochenmark ständig Ersatz gebildet werden. Die undifferenzierten, meist ruhenden Vorläuferzellen differenzieren über verschiedene Zwischenstufen zu den reifen PMN bzw. Monozyten. Dabei gilt generell, dass mit der zunehmenden Differenzierung die proliferative Potenz der Vorläuferzellen abnimmt (Kriegler, Verschoor 1994).

Da sich der Verbrauch vor allem von PMN, z.B durch eine Infektion, stark erhöhen kann, existieren verschiedene Mechanismen des Knochenmarks, einem erhöhten Verbrauch Rechnung zu tragen. Die schnellste Antwort besteht im Auswandern von reifen PMN, die sich zu jeder Zeit im Knochenmark befinden (Junqueira, Carneiro 1995). Daraus resultiert in der Knochenmarkshistologie eine sogenannte „Linksverschiebung“, mit Überwiegen von unreifen

Vorläuferzellen. Darüber hinaus ist unter normalen Umständen eine relativ hohe Rate an Apoptose der hämatopoetischen Zellen zu verzeichnen, die auf Stimulation gesenkt wird (Kriegler, Verschoor 1994). Ausserdem kann durch beschleunigte Reifung der unreifen Vorläufer akut eine größere Zahl von Effektorzellen produziert werden. Schließlich ist noch die Möglichkeit der Expansion des primitiven Stammzellpools gegeben, der bei unveränderter Apoptoserate nach einiger Latenz in eine höhere Produktion mündet (de Haan, Dontje 1996).

Verschiedene proinflammatorische Zytokine wie Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor (G-CSF), GM-CSF, IL-1, IL-6, und IL-12, sind an dieser Regulation durch ihre Wirkung auf Stammzellen und differenziertere Vorläuferzellen beteiligt, die die oben erwähnten Effekte auslöst (Kriegler, Verschoor 1994).

### **1.1.3. Das adaptive Immunsystem**

Die Zellen des adaptiven Immunsystems zeichnen sich im Gegensatz zu Zellen des innaten Immunsystems durch die Fähigkeit aus, eine sehr große Zahl von Strukturen spezifisch erkennen zu können. Diese Erkennung basiert auf dem Rezeptor der T- und B-Zellen, der nicht wie die PRR-Rezeptoren in der Keimbahn vererbt wird, sondern für jede neu gebildete T- oder B- Zelle aus verschiedenen Gensequenzen im Rahmen des sogenannten Gen-Rearrangements zusammengesetzt wird. Durch zufällige Kombination und Mutationen entsteht auf diese Weise eine extrem grosse Zahl von Rezeptoren mit verschiedenen Spezifitäten (Janeway, Travers 1997). Die Entwicklung von der „naiven“ T-Zelle, zur „bewaffneten“, d.h. zur Ausübung ihrer immunologischen Funktion (Stimulation von APZ oder B-Zellen, Abtötung infizierter Zellen) befähigten T-Zelle setzt nach heutigem Wissen drei Dinge voraus: eine Stimulation des Rezeptors der T-Zelle, ein kostimulatorisches Signal über den CD28-Rezeptor über CD80 oder CD 86, das professionelle antigenpräsentierende Zellen auf ihrer Oberfläche tragen, und Stimulation mittels bestimmter Zytokine, die nach dem heutigen Stand der Forschung die Differenzierung zumindest der CD4-positiven T- Zellen entscheidend mitbeeinflussen (Janeway, Travers 1997).

## 1.2 Immunsuppression nach Chemotherapie

In der Chemotherapie bösartiger Tumoren werden heute vorwiegend Medikamente eingesetzt, die vor allem proliferierende Zellen schädigen. Nach ihrer Hauptwirkung, einer Hemmung der Zellteilung, heißen diese Medikamente Zytostatika. Je nach Art des Medikaments werden ruhende Zellen mitgeschädigt, oder bleiben unversehrt. Leider ist die Wirkung nicht spezifisch für bösartiges Gewebe, so daß auch blutbildendes Knochenmark, das adaptive Immunsystem und die Epithelien als Gewebe mit hoher Zellteilungsaktivität in Mitleidenschaft gezogen werden.

### 1.2.1. Angeborenes Immunsystem

Die stärkste Schädigung betrifft die Zellen der Hämatopoese, die durch die Wirkung von Zytostatika den programmierten Zelltod einleiten. So wurde beispielsweise nach Administration des Antimetaboliten 5-Fluorouracil, dessen Hauptwirkung in einer Blockade der Thymidylatsynthetase besteht, in der Maus nach vier Tagen eine starke Abnahme der Zellularität des Knochenmarks beobachtet, mit dem Resultat, dass fast keine hämatopoetischen Zellen in der Histologie sichtbar waren (Radley, Scurfield 1979).

Diese Schädigung der Hämatopoese wirkt sich vor allem durch einen Ausfall der Produktion von PMN aus, so dass die Zahl der PMN im Blut rapide zurückgeht. In dieser Phase der Neutropenie sind die Patienten besonders anfällig für Infektionen, die zum größten Teil aus dem eigenen Respirations- und Gastrointestinaltrakt kommen, und die durch die gleichzeitig auftretenden Epitheldefekte begünstigt werden (Herold 2003).

### 1.2.2. Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem wird auf zweifache Weise geschädigt. Zum einen wird die Hauptzahl von dendritischen Zellen im Knochenmark analog den PMN produziert. Eine Chemotherapie wirkt sich auf deren Produktion hemmend aus, so dass die Funktionalität des adaptiven Immunsystems durch eine Störung des antigen-präsentierenden Systems kompromittiert ist. (Nakano, Hayashi 1991). Ausserdem fügen bestimmte Medikamente auch den ruhenden Lymphozyten Schaden zu, der sich noch lang nach der Applikation des Medikaments in

verminderter Antikörperproduktion und verminderter proliferativer Reaktion auf Mitogene niederschlägt (Moynihan, Cohen 1989).

### **1.2.3. Bisher angewandte Therapiestrategien**

Um Patienten, die nach einer Chemotherapie gegen eine bösartige Erkrankung an den geschilderten Nebenwirkungen leiden, vor den Gefahren einer Infektion zu schützen, werden derzeit mehrere Strategien angewandt. Dabei muss zwischen den verschiedenen Erregern, die hauptsächlich diese immungeschwächten Patienten gefährden (sogenannten opportunistischen Erregern), differenziert werden.

Zum einen wird versucht, im Sinne einer Expositionsprophylaxe den Patienten so wenig wie möglich den für sie gefährlichen Erregern auszusetzen. Dazu werden Patienten, die eine schwere Neutropenie aufweisen, isoliert, und mit keimarmer Nahrung versorgt. Des weiteren müssen Blutprodukte, die diese Patienten erhalten, auf das Vorhandensein von Cytomegalievirus (CMV), das bei immunsupprimierten Patienten gefährliche Pneumonien verursachen kann, getestet werden.

Beim Auftreten von Fieber in der Phase der Neutropenie wird meist eine Therapie mit einem Breitspektrum-Antibiotikum begonnen, bereits bevor der Erreger identifiziert werden kann. Da die Gefahr einer Sepsis mit Tod des Patienten in diesem Zustand sehr groß ist, muss mit der Therapie schnell begonnen werden (Herold 2003).

Am ehesten einer kausalen Therapie entspricht die Behandlung mit Zytokinen, die das blutbildende Knochenmark stimulieren, und über eine Verkürzung der Differenzierungsdauer für PMN eine frühere Restitution des eigenen innatens Immunsystems bewirken. Derzeit wird im klinischen Alltag vor allem G-CSF verwendet, gefolgt von GM-CSF. Die Wirkung dieser Therapie ist bei hohen Kosten allerdings umstritten. Eine Metaanalyse von klinischen Studien mit widersprüchlichem Ergebnis kam zu dem Schluss, dass der Einsatz von G-CSF und GM-CSF keinen Vorteil bezüglich der Sterblichkeit in der Neutropeniephase erbringt (Berghmans, Paesmans 2002). Es scheint jedoch Unterschiede zwischen der Wirksamkeit von G-CSF und GM-CSF zu geben. GM-CSF zeigt zusätzlich zur verfrühten Erholung der Granulozytenzahlen bessere infektvermeidende Wirkung. Zusätzlich ist noch ein Benefit bezüglich der Antitumoraktivität des Immunsystems vorhanden, ebenso eine Wirkung als Adjuvans (Buchsel,

Forgey 2002). Insgesamt gesehen wird aber auch bei einem Einsatz von GM-CSF der klinische Nutzen in Bezug auf infektiobedingte Todesfälle angezweifelt. (Berghmans, Paesmans 2002).

### 1.3. Wirkungsweise von CpG-ODN

Wie bereits erwähnt, erkennt das Immunsystem durch DNA-Kodierte Rezeptoren bestimmte strukturelle Merkmale von Fremdorganismen, und reagiert darauf mit einer Aktivierung. Diese sogenannten „Pathogenassoziierten Molekülstrukturen“ (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPS) umfassen sowohl das Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand gramnegativer Bakterien, als auch Doppelstrang-RNA, Lipoteichonsäuren und andere bakterielle und virale Komponenten. In den letzten zehn Jahren wurde auch eine immunstimulierende Wirkung von bakterieller, unmethylierter DNA nachgewiesen. Genauere Untersuchungen ergaben, dass ein Palindrom, bestehend aus der Sequenz Purin-Purin-Cytosin-Guanosin-Pyrimidin-Pyrimidin die stärkste stimulatorische Aktivität, gemessen an der Produktion von Zytokinen und der Aktivierung von Makrophagen zeigte (Krieg 2002). DNA prokaryonter Organismen enthält das betreffende Cytosin-Phosphat-Guanosin (CpG)-Motiv mit einer statistisch erwarteten Häufigkeit von 1/16 pro Basenpaar, während es in der DNA eukaryonter Organismen lediglich mit einem Fünftel dieser Frequenz zu finden ist. Man spricht in diesem Bezug von einer CpG-Suppression. Darüber hinaus ist CpG in prokaryonter DNA nie, in eukaryonter DNA mit einer Häufigkeit von 60-90% methyliert (Bird 1986). Es konnte gezeigt werden, dass durch diese Methylierung die immunstimulierende Wirkung von CpG aufgehoben wird (Sparwasser, Miethke 1997). Daraus folgt, dass durch die Erkennung unmethylierter CpG-Motive in DNA dem Immunsystem eine relativ zuverlässige Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ möglich ist.

Diese Differenzierung scheint aber nicht immer zu funktionieren. Bei an Lupus erythematodes erkrankten Patienten werden Zellen des Immunsystems durch Komplexe aus eigener DNA mit gegen DNA gerichteten Autoantikörpern aktiviert, somit kann diesem Mechanismus auch eine pathogenetische Rolle bei einer wichtigen Autoimmunerkrankung zugeschrieben werden (Means, Latz 2005)

Einige dieser PAMPs werden durch Rezeptoren erkannt, die strukturell mit dem Toll-Rezeptor der Fruchtfliege *Drosophila* verwandt sind, und darum Toll-like Receptors (TLR) genannt werden. So erkennt beispielsweise TLR4 das LPS gramnegativer Bakterien, und auch für CpG-

DNA konnte mit TLR9 ein spezifischer Rezeptor aus dieser Familie beschrieben werden (Hemmi, Takeuchi 2000).

Die Effekte von CpG-ODN wurden bisher vor allem im murinen Immunsystem untersucht. Nach einer Injektion von CpG-ODN werden verschiedene proinflammatorische Zytokine im Serum messbar, wie Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-12, und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- $\alpha$  (Lipford, Sparwasser 1997). Bei Exposition von Makrophagen der Maus *in vitro* mit CpG-ODN wurde darüberhinaus eine Zunahme der phagozytotischen Aktivität beobachtet, sowie eine Produktion von GM-CSF.

### **1.3.1. Wirkung auf die Hämatopoese**

Vor allem die durch CpG-DNA induzierten Zytokine IL-1, IL-6 und IL-12 haben deutliche Wirkung auf die Hämatopoese. So bewirkt IL-12 eine Expansion des Pools an undifferenzierten Stammzellen, sogenannten High Proliferative Potential- Colony Forming Cells (HPP-CFC), und eine Auswanderung hämatopoetischen Gewebes vom Knochenmark in die Milz (Jackson, Yan 1995), IL-1 und IL-6 beschleunigen die Reifung von PMN im Knochenmark (Takatsuki, Okano 1990; Kovacs, Kerr 1998). Aus diesen Beobachtungen lässt sich die Vermutung ableiten, dass mit CpG-DNA eine Stimulation des Knochenmarks zu beschleunigter Erholung nach zytostatischer Therapie möglich sein müsste, ähnlich der bereits mit G-CSF in der Klinik durchgeführten Therapie. Tatsächlich zeigten die Experimente mit Mäusen, deren Knochenmark durch Bestrahlung sublethal geschädigt wurde, dass eine Behandlung mit CpG-DNA eine erhöhte Überlebensrate in einem Infektionsmodell mit *Listeria monocytogenes* und beschleunigte Erholung der Zahl von hämatopoetischen Vorläuferzellen bewirkt (Sparwasser, Hultner 1999). Eine direkte Wirkung auf das Knochenmark und die Zahl der zirkulierenden PMN wurde bisher jedoch nicht beschrieben.

### **1.3.2. Wirkung auf Zellen des innate Immunsystems**

Aus *in-vitro*-Experimenten ist bekannt, dass CpG-DNA murine Makrophagen aktiviert. Es wird eine erhöhte Phagozytoseaktivität gemessen, und Enzyme wie die induzierbare NO-Synthetase, die der Abtötung phagozytierter Mikroorganismen dienen, werden synthetisiert (Utaiincharoen, Anuntagool 2002). Des weiteren produzieren Makrophagen einige proinflammatorische Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-12, GM-CSF und TNF $\alpha$  (Takeshita, Takeshita 2000).

Eine Vorbehandlung mit CpG-DNA versetzt Mäuse wahrscheinlich durch Akkumulation von PMN in die Lage, einer Infektion an der Stelle der vorhergegangenen CpG-Injektion besser zu widerstehen. Die dort vorgefundenen PMN zeigen wie Makrophagen aus in-vitro-Experimenten einen gesteigerten oxydativen Stoffwechsel, höhere Expression von phagozytotischen Oberflächenrezeptoren, sowie gesteigerte Phagozytose (Weighardt, Feterowski 2000).

### **1.3.3. Wirkung auf Zellen des adaptiven Immunsystems**

Die Lymphknoten als Organe des adaptiven Immunsystems reagieren mit einer drastischen Veränderung ihrer zellulären Zusammensetzung auf eine Injektion von CpG-DNA in das jeweilige Drainagegebiet. Es folgt eine mehrere Tage andauernde Größenzunahme des Lymphknotens, der Anteil von APZ steigt überproportional, und die Bereitschaft, auf Antigene zu reagieren, ist drastisch erhöht. (Lipford, Sparwasser 2000). Darüber hinaus existiert unter anderem ein direkter Effekt auf B-Lymphozyten, die zur Zellteilung angeregt werden (Krieg, Yi 1995).

## 2. Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollen die Effekte von synthetischen CpG-ODN auf eine im Mausmodell experimentell durch Chemotherapie herbeigeführte Immunsuppression untersucht werden.

Die Arbeit befasst sich hauptsächlich mit den Wirkungen auf die Hämatopoese. Zunächst sollen die Effekte von CpG-ODN auf die unbeeinträchtigte Hämatopoese untersucht werden. Dies soll anhand der Veränderungen der Parameter Zellularität, Zusammensetzung des Knochenmarks und Produktion verschiedener Zelltypen durch CpG ODN geprüft werden.

Des Weiteren soll ein möglicher Nutzen der Behandlung auf eine Immunsuppression nach Chemotherapie mit 5-Fluorouracil evaluiert werden. 5-Fluorouracil wurde als Chemotherapiemodell gewählt, da es eine signifikante Neutropenie verursacht. In dieser Situation kann eine Wirkung einer Injektion von CpG-ODN durch den Vergleich der Zahl von PMN im peripheren Blut sichtbar werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Mäuse

In den Tierversuchen wurden weibliche Balb/C und C57/Bl6 Mäuse im Alter von 8-12 Wochen verwendet. Die Haltung erfolgte pathogenfrei im Institutstierstall. Die Mäuse wurden mit angesäuertem Wasser und Mausfutter ad libitum versorgt, sowie gelegentlich mit Toilettenrollen als Spielzeug.

### 3.2. Behandlung, Injektionen

#### 3.2.1. 5-Fluorouracil

(5FU) wurde freundlicherweise von Ribosepharm (München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das Medikament wurde intraperitoneal in 200µl isotonischer Kochsalzlösung mit einer Dosis von 3mg/Maus gespritzt.

#### 3.2.2. CpG ODN

Als CpG-Oligodesoxynukleotid wurde phosphothioat-modifiziertes 1668 (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland) aufgrund seiner bereits mehrfach beschriebenen immunstimulatorischen Eigenschaften im Maussystem gewählt. Unter anderem war mit diesem CpG ODN bereits eine rekonstituierende Wirkung auf Stammzellen im Knochenmark nach subletaler Bestrahlung gezeigt worden (Sparwasser, Hultner 1999).

Sequenz 1668: 5' - TCC ATG <u>ACG TTC</u> CTG ATG CT - 3'
---

Die Phosphothioat-Modifizierung von Oligodesoxynukleotiden bewirkt verstärkte Resistenz gegen den Abbau durch DNasen (Stein, Subasinghe 1988). CpG ODN 1668 wurde in einer 250µM Stammlösung mit sterilem Ultra-Pure Wasser (Biochrom, Berlin, Deutschland) angesetzt,

und durch 0,2µm-Filter steril filtriert. Zur intraperitonealen Injektion wurden 10nmol in 250µl PBS verwendet.

### 3.3. Organentnahme und Analysemethoden

#### 3.3.1. Blutabnahme und Differentialzählung

Zur Blutentnahme wurden die Mäuse kurze Zeit unter eine handelsübliche Rotlichtlampe (Siemens, München, Deutschland) gesetzt, um durch die Wärme eine Erweiterung der Schwanzvenen zu erreichen. Die Inzision wurde mit einer sterilen Kanüle durchgeführt, und das austretende Blut in eine EDTA-beschichtete 20µl-Kapillare (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) aufgenommen. Um einen zu großen Blutverlust bei repetitiver Blutabnahme zu vermeiden, wurde die Inzisionsstelle am Schwanz mit einem sterilen Tupfer komprimiert.

Erythrozyten- Thrombozyten- und Leukozytenzahlen wurden mit einem vet ABC Blutzellzähler (scil animal care, Viernheim, Deutschland) bestimmt. Zur Berechnung der Granulozytenzahlen wurden Differenzialzählungen an Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen vorgenommen, und die Prozentzahl von PMN mit der absoluten Leukozytenzahl multipliziert.

#### 3.3.2. Peritonealzellen

Zur Gewinnung von Peritonealzellen wurden die Mäuse durch Kohlendioxid getötet. Peritonealzellen wurden durch Spülung der Peritonealhöhle mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (Firma PAN) mit einem Zusatz von 2% fötalen Kälberserum (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) geerntet. Nach einer Supravitalfärbung mit Eosin wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in PBS mit 2% fötalem Kälberserum (FKS) einmal gewaschen.

#### 3.3.3. Knochenmarkshistologie

Zur Gewinnung von Lendenwirbelkörpern für Knochenmarkshistologie wurden die Mäuse mit Kohlendioxid getötet, und die Wirbelkörper mit einem Skalpell freipräpariert. Zwei Wirbelkörper wurden im Block entnommen, von Muskelgewebe gereinigt, und zur Fixierung in Schäffer'sche Lösung aus 2% Glutaraldehyd, 1% Formaldehyd und 8% Calciumazetat (Sigma, Deisenhofen,

Deutschland) gelegt. Nach zwei Tagen wurden die Proben in EDTA-Lösung zur Entkalkung überführt und für zwei weitere Tage darin belassen. Daran schloss sich Einbettung, Schneiden und Färben nach Routinemethoden der klinischen Pathologie an.

### **3.3.4. Präparation von Knochenmarkszellen**

Für Durchflusszytometrie und Knochenmarkszellkultur wurden je zwei Oberschenkelknochen nach Präparation entnommen. Die Oberschenkelknochen wurden nach der Entnahme zur Abtötung möglicher bakterieller Kontamination für jeweils fünf Minuten in 75% Ethanol eingelegt, wie bereits beschrieben (Inaba, Inaba 1992).

Danach wurden die Epiphysen abgeschnitten, und der Markraum mit Low Endotoxin RPMI (Biochrom, Berlin) mittels einer Einmalspritze mit Kanüle durchgespült. Um eine Einzelzellsuspension herzustellen, folgte ein wiederholtes Pipettieren durch eine 1000µl-Pipettenspitze.

Die so gewonnenen Zellen wurden zur Lyse reifer Erythrozyten in Tris-NH<sub>4</sub>Cl (Sigma, Deisenhofen, München) suspendiert. Nach fünf Minuten wurde mit PBS 2% FKS aufgefüllt, und nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen. Eine Supravitalfärbung wurde mit Eosin durchgeführt, und die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

### **3.3.5. Knochenmarkszellkultur**

Knochenmarkszellen benötigen zum Wachstum bestimmte Wachstumssignale. Diese werden zum Teil durch Kontakt mit dem Knochenmarksstroma gegeben, zum Teil erreichen sie das Knochenmark in löslicher Form. Bei Abwesenheit dieser Wachstumssignale leiten die Vorläuferzellen den programmierten Zelltod ein.

Zur Kultivierung dendritischer Zellen wurde ein von Inaba leicht abgewandeltes Protokoll verwendet, das als Wachstumssignal das Zytokin GM-CSF verwendet (Inaba, Inaba 1992).

Als Zellkulturmedium wurde Low-Endotoxin-RPMI 1640 mit L-Acetyl-Alanyl-Glutamin (Biochrom, Berlin) mit folgenden Zusätzen eingesetzt:

Bezeichnung	Herkunft	Konzentration
Penicillin	Biochrom, Berlin	50 000 U/l
Streptomycin	Biochrom, Berlin	50 mg/l
Mercaptoethanol	Gibco BRL	50µM
Fötales Kälberserum	Sigma Chemicals, St. Louis, USA	10%
GM-CSF	Irene Seemüller, Institut f. Mikrobiologie	4ng/ml

1/40 der aus zwei Femurknochen gewonnenen Zellen wurde in 1,25ml Kulturmedium in 6-Well-Flachbodenplatten in einem Inkubator bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Am vierten Tag der Kultur wurden weitere 1,25ml des o.g. Mediums angewärmt und zugegeben.

Zur Ernte wurden die Kulturen gespült, und adherente Zellen mit einem Schaber aus den Platten gekratzt. Die geernteten Zellen wurden mit Supravitalfärbung wie bereits beschrieben in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

### 3.3.6. Analyse von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie kann man Zellen nach ihrer Größe („forward scatter“ = FS), nach ihrer Granularität („sideward scatter“ = SS) und nach ihrer Fluoreszenz beurteilen.

Die Fluoreszenz der Zellen ist abhängig von dem Grad ihrer Eigenfluoreszenz und den verwendeten Antikörpern. Die Antikörper, die gegen verschiedene Oberflächenantigene der Zellen gerichtet sind, sind mit Farbstoffen markiert. Durch Einsatz unterschiedlicher Antikörper, die z.B. gegen Differenzierungsoberflächenantigene („linage marker“) gerichtet sind, kann die Anzahl von Zellen eines bestimmten Typs in einer gemischten Zellpopulation bestimmt werden. Beispielsweise lassen sich dendritische Zellen (DZ) anhand der Expression von CD11c von anderen Zellen, denen dieser Marker fehlt, differenzieren. Des weiteren ist es möglich, Zellen verschiedenen Aktivierungs- oder Reifungsgrades anhand bestimmter Marker zu unterscheiden, beispielsweise weisen reife DZ große Mengen von MHCII auf der Oberfläche auf, während bei unreifen DZ dieser Marker fehlt (Sparwasser, Koch 1998). Ein Problem dieser Methode stellt die unspezifische Bindung von Antikörper oder Farbstoff dar. Manche Zellen, vor allem Makrophagen und DZ, besitzen Oberflächenrezeptoren, die Antikörper an ihrer konstanten Region, oder an dem gekoppelten Farbstoff binden. Dies führt zu einer unerwünschten

Markierung von Zellen, die das gesuchte Oberflächenantigen nicht besitzen, und muss durch eine Blockierung dieser Rezeptoren mit gegen sie gerichteten Antikörpern ( $\alpha$ CD-16/CD32) verhindert werden.

Zum Ausschluss unspezifischer Bindung ist es gerade bei dendritischen Zellen nötig, Parallelfärbungen mit Antikörpern desselben Typs und mit demselben Farbstoff vorzunehmen, die kein an diesen Zellen spezifisches Antigen erkennen können, und nur unspezifisch gebunden werden können. Dies wurde in den dargestellten Experimenten jedes Mal durchgeführt, um die Rate falsch positiver Zellen erkennen, die dann von der Rate der positiven Zellen in der spezifischen Färbung abgezogen wurden.

Für die spezifischen Färbungen wurden die Zellen in einem Volumen von 50 $\mu$ l PBS mit 2% FKS bei 4°C inkubiert. Von Anfang an war 2 $\mu$ l  $\alpha$ -CD16/CD32 zur Vermeidung der unspezifischen Bindung von Antikörper oder Farbstoff beigegeben. Dazu wurde nach 15 Minuten 50 $\mu$ l PBS/2%FKS mit den spezifischen Antikörpern in optimaler Menge gegeben, 30 min. bei 4°C inkubiert und daraufhin zweimal mit PBS mit 2 % FKS gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden mit 1% Paraformaldehyd Lösung fixiert und durchflußzytometrisch an einem Durchflußzytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Diego, USA) analysiert. Um sichere Aussagen über Zellpopulationen treffen zu können, wurden mindestens 10000 Zellen analysiert.

Für die Färbungen wurden Antikörper gegen folgende Oberflächenantigene verwendet:

Oberflächenantigen	Herkunft des Antikörpers	Ursprungsspezies
CD3	BD PharmIngen, Heidelberg	Ratte
CD11b/Mac1	BD PharmIngen, Heidelberg	Ratte
CD 11c	BD PharmIngen, Heidelberg	Armenischer Hamster
CD 117 (c-kit)	BD PharmIngen, Heidelberg	Ratte
TER 119	BD PharmIngen, Heidelberg	Ratte
CD-45R/B220	BD PharmIngen, Heidelberg	Ratte
Ly-6G/Gr1	BD PharmIngen, Heidelberg	Ratte
MHC II (I-A <sup>d</sup> /I-E <sup>d</sup> )	BD PharmIngen, Heidelberg	Ratte

### 3.4. Statistik

Signifikante Unterschiede zwischen Behandlungsgruppen wurden bei einer Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art ( $p < 0,05$ ) angenommen. Die Wahrscheinlichkeiten wurden unter Zuhilfenahme von Student's T-Test berechnet.

Alle hier dargestellten relevanten Ergebnisse wurden in mindestens einem weiteren unabhängigen Experiment bestätigt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Analyse der nach CPG-ODN-Injektion eingewanderten Peritonealzellen**

Weighardt et al. beschrieben eine erhöhte Resistenz gegen polymikrobielle Sepsis, die durch chirurgische Einlage eines Shunts in das Colon Ascendens und damit eine Peritonitis durch Darmbakterien verursacht war, wenn die betreffenden Mäuse 6 Tage zuvor eine intraperitoneale Injektion von CpG ODN erhalten hatten. Es wurde ein geringer Influx von PMN in die Peritonealhöhle nach der Injektion beschrieben (Weighardt, Feterowski 2000).

Hier wurde die Zusammensetzung der Peritonealzellen von weiblichen Balb/C-Mäusen analysiert, die mit 10nmol CpG ODN zu verschiedenen Zeitpunkten vorinjiziert wurden, ohne einen folgenden chirurgischen Eingriff. Die Zellen wurden gezählt, und anschließend mit entsprechenden Antikörpern für die durchflußzytometrische Analyse gefärbt.

#### **4.1.1. Granulozyten**

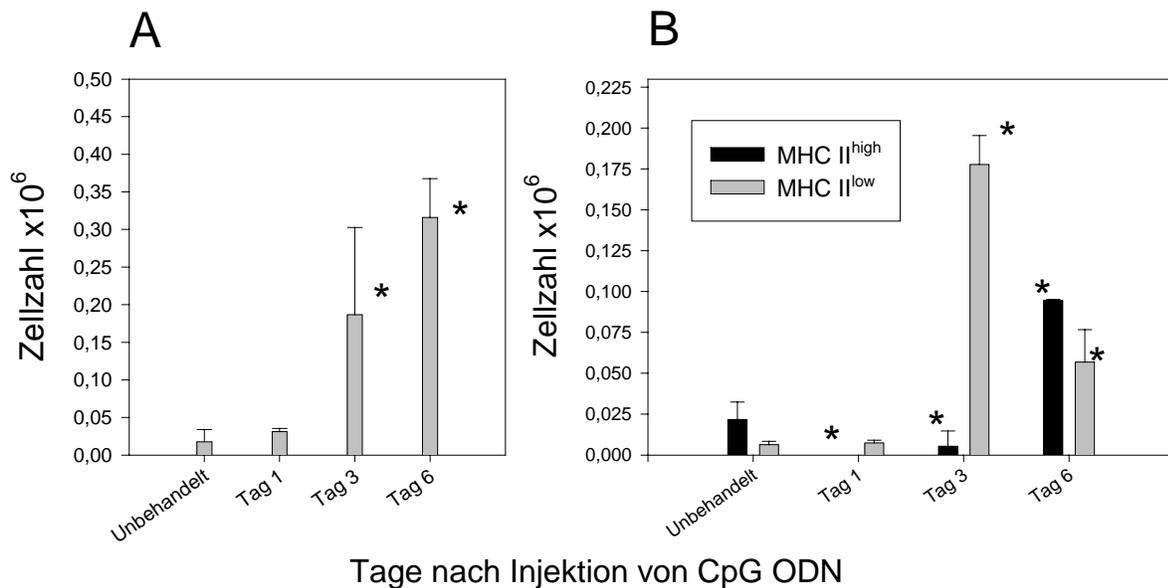
Dabei zeigte sich im Gegensatz zu Weighardt et al. ein starker Influx von Gr1 und Mac1-positiven Zellen, die nach Lagasse aufgrund ihres Färbeverhaltens als neutrophile Granulozyten zu identifizieren waren, bereits drei Tage nach Injektion (Lagasse, Weissman 1996) (Abb.1A). Dieser Influx war 6 Tage nach Injektion am ausgeprägtesten.

#### **4.1.2. Dendritische Zellen**

Es gibt zahlreiche Hinweise auf eine Migration von dendritischen Zellen in das Injektionsfeld von CpG ODN. Lipford et al. beschrieben beispielsweise eine deutliche Zunahme der Zahl dendritischer Zellen im Lymphknoten, in dessen Drainagegebiet CpG injiziert worden war (Lipford, Sparwasser 2000).

So wurden die Peritonealzellen obiger Mäuse auf dendritische Zellen mittels der Färbung auf CD11c, ein für DZ spezifisches Adhäsionsmolekül, und MHCII untersucht. Es fand sich nach

Abzug der in der Isotypenkontrolle falsch positiven Zellen überraschenderweise einen Tag nach Injektion ein völliges Fehlen MCHII hoch exprimierender, damit z.B. nach Larsen als reif anzusehender DZ (Larsen, Ritchie 1994). Ein signifikanter Influx von CD11c-positiven Zellen zeigt sich 3 Tage nach der Injektion (Abb.1B). Diese Zellen zeigten überwiegend eine sehr niedrige Expression von MHCII, wie für unreife dendritische Zellen beschrieben. Sechs Tage nach Injektion bestand die CD11c-positive Zellpopulation etwa zu gleichen Teilen aus reifen und unreifen Zellen.



**Abb.1: CpG ODN verändern die Zusammensetzung der Peritonealzellen nach intraperitonealer Injektion.** Jeweils drei weibliche Balb/C-Mäuse wurden zum angegebenen Zeitpunkt vor der Untersuchung mit CpG ODN injiziert (Ausnahme für Tag 6: zwei Mäuse). Die Peritonealzellen wurden ausgespült und durchflusszytometrisch analysiert. A: Mac1-Gr1-doppelt positive neutrophile Granulozyten und B: CD11c-positive dendritische Zellen (n.d.= nicht nachweisbar, \* Unterschied zur Kontrolle auf 5%-Niveau signifikant).

## 4.2. Veränderungen im Blutbild nach Injektion von CpG ODN

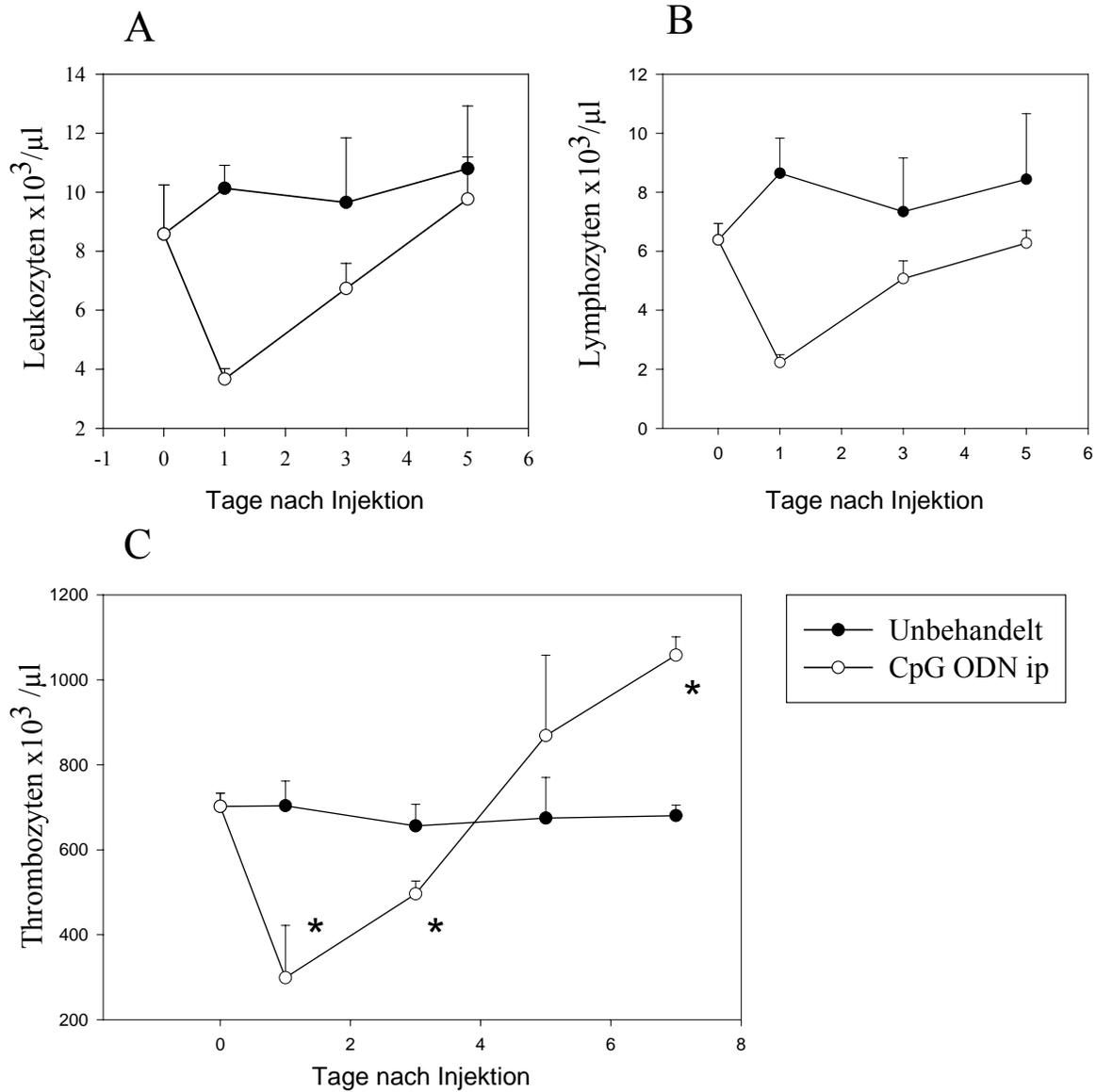
CpG ODN stellen einen proinflammatorischen Stimulus dar, der zu einer Art „aseptischer Entzündung“ führt (Wagner 2002). Verschiedene Elemente des Blutbildes zeigen üblicherweise unterschiedliche Veränderungen während einer Infektion. Die Zahl von PMN steigt bei bakteriellen Infektionen, die Lymphozytenzahlen sinken (Herold 2003).

Auch Veränderungen der Thrombozytenzahl im peripheren Blut finden sich häufig. Beispielsweise steigt während der aktiven Phase einer Infektion die Zahl der zirkulierenden Blutplättchen, während sie beim septischen Schock durch verschiedene Mechanismen deutlich reduziert wird (Senaldi, Piguet 1998)

Nach der beobachteten Akkumulation von PMN in der Peritonealhöhle (s.o.), lagen Veränderungen der Blutkonzentrationen dieser Zellen im Rahmen der Einwanderung nahe. Blutbilduntersuchungen nach Injektion von CpG ODN bei weiblichen Balb/C Mäusen zeigten einen rapiden Abfall der Leukozytenzahlen in den ersten 24 Stunden (Abb.2A). Differentialzählungen ergaben, dass hauptsächlich die Lymphozytenzahl absank (Abb.2B). Diese Veränderung war nur transienter Natur, etwa 5 Tage nach der Injektion wurden die Ausgangswerte wieder erreicht. Bei den Granulozytenzahlen konnte im beobachteten Zeitraum keine derartige Veränderung festgestellt werden (nicht dargestellt).

Die Blutplättchen (Thrombozyten) werden von Knochenmarksriesenzellen, den sogenannten Megakaryozyten, gebildet. Diese schnüren Teile ihres Zytoplasmas ab, die in die Knochenmarksblutgefäße hineinreichen, und die dann als Thrombozyten blutungsstillende Funktion haben (Junqueira, Carneiro 1995).

Die Zahl der zirkulierenden Blutplättchen war nach CpG ODN im Sinne einer transienten Thrombopenie auffällig (Abb.2C). Nach vier Tagen wurden wieder Normalwerte erreicht, jedoch stiegen die Thrombozytenzahlen danach über die Normalwerte an.



**Abb. 2: CpG ODN verursachen transiente Lympho- und Thrombozytopenie.** Drei Balb/C-Mäuse wurden intraperitoneal mit CpG ODN injiziert, und die Blutbilder mit denen dreier unbehandelter Kontrollmäuse verglichen. Nach 24h waren die Leukozyten (A) - und Lymphozytenzahlen (B) stark gefallen, desgleichen die Thrombozytenkonzentration (C). In den folgenden Tagen normalisierte sich die Zahl wieder, bzw. stieg über den Normwert an. (\* Unterschied zur Kontrolle auf 5%-Niveau signifikant)

### 4.3. Histologische Veränderungen im Knochenmark

Um Veränderungen des Knochenmarks, des Organs der Blutbildung, grob erfassen zu können, wurden zunächst histologische Untersuchungen von Knochenmarksschnitten zu verschiedenen Zeitpunkten nach CpG-Injektion vorgenommen.

In zwei unabhängigen Experimenten wurden jeweils zwei Mäuse drei und sechs Tage vor der Untersuchung mit CpG ODN intraperitoneal injiziert. Zwei Mäuse dienten als Kontrolle. Die Histologie wurde an jeweils zwei Lendenwirbelkörpern durchgeführt, die nach Tötung der Mäuse entnommen, fixiert und entkalkt wurden. In der Histologie können vor allem Elemente der Erythropoese und der Granulopoese beurteilt werden, die zwischen den angeschnittenen Knochen trabekeln liegen. In die Beurteilung gehen dabei vermehrtes oder vermindertes Vorkommen der Zellen einer Reihe ein. Zudem kann bei Zellen der Granulopoese der Reifegrad bestimmt werden. Unreifere Zellen zeichnen sich durch sehr helle, runde Kerne mit lockerem Euchromatin aus, und haben wenig Zytoplasma. Reifere Zellen imponieren mit dunkleren Kernen, die kondensiertes Heterchromatin enthalten, und entweder stabförmig oder ringförmig geformt sind.

Überwiegen eher unreifere Zellen, spricht man von einer Linksverschiebung. Diese ist in der Routinehistologie z.B. bei septischen Patienten mit hohem Verbrauch an PMN zu finden. Beim Überwiegen reiferer Zellelemente spricht man dagegen von einer Rechtsverschiebung (Junqueira, Carneiro 1995).

#### 4.3.1. Erythropoese

Erythrozyten werden im Knochenmark aus unreifen Vorläuferzellen gebildet. Es gruppieren sich jeweils mehrere Zellen um einen Knochenmarksmakrophagen, der sie mit Eisen für die Hämoglobinsynthese versorgt, und den gegen Ende der Entwicklung ausgestoßenen Zellkern aufnimmt. Dieser Makrophage wird als „Amme“ bezeichnet, die Gruppe von Zellen histologisch als „Erythron“. Erythrozytenvorläufer zeichnen sich histologisch, außer durch die Lage in Gruppen, durch ein schmales Zytoplasma bei kondensiertem Kern aus, und wirken in der Färbung dunkler als die Zellen der myeloischen Reihe. Ein Erythron imponiert also als Gruppe kleiner, dunkler Zellen, die oft um eine größere Zelle angeordnet sind (Abb.3)

Drei Tage nach Injektion von CpG ODN (Abb.3B) zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb.3A) eine deutliche Abnahme der gesamten Zellularität des Knochenmarks. Die Knochenmarksinus, die in der Histologie nach Auswaschung des darin befindlichen Blutes als leere Räume imponieren, nehmen infolge der geringeren Zellularität deutlich an Durchmesser zu. Auch die Zahl der roten Vorläuferzellen ist deutlich vermindert, im Vergleich zum normalen Mark fehlten Erythra fast gänzlich. Auffällig war außerdem das Auftauchen von braunem Eisenpigment in den Makrophagen des Knochenmarksraumes (Abb.3B).

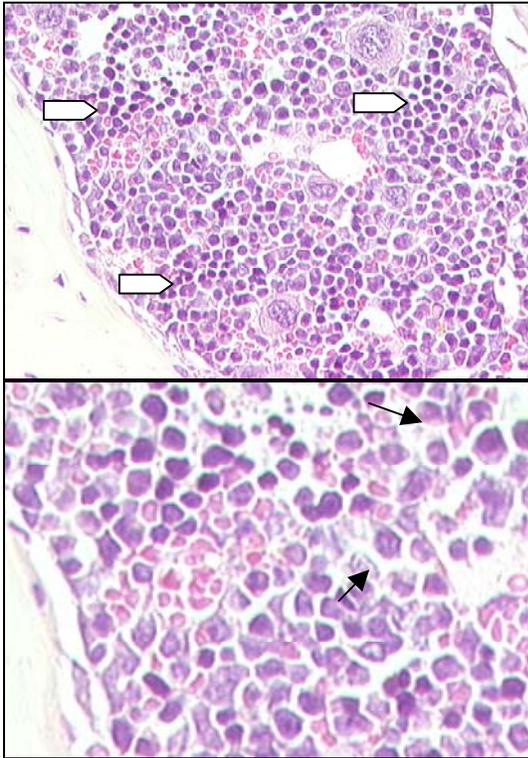
Sechs Tage nach der Injektion waren wieder einige Erythra zu sehen, die in der Zahl jedoch noch nicht die der Kontrolle erreicht hatten (Abb.3C).

#### **4.3.2. Granulopoese**

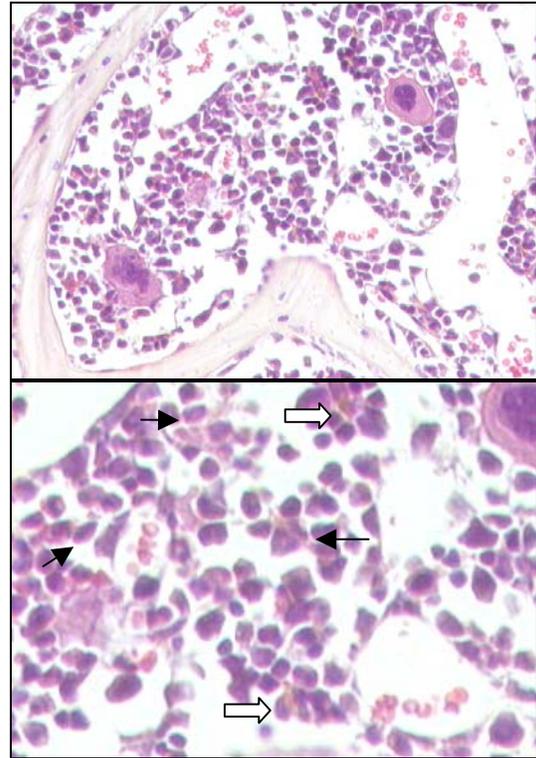
Im Vergleich zur Kontrolle war auch bei den Zahlen der granulopoetischen Reihe histologisch eine deutliche Abnahme drei Tage nach der Injektion zu verzeichnen. Interessanterweise herrschen eher reifere Formen vor (kondensierter, ring- oder bandförmiger Nukleus, Abb.3B) Unreife Zellen, die sich durch einen hellen, lockeren Zellkern mit reichlich Euchromatin auszeichnen, fehlen im Knochenmark drei Tage nach der Injektion von CpG ODN. Man kann bezüglich der Granulopoese also von einer Rechtsverschiebung hin zu reiferen Zellen sprechen.

Sechs Tage nach Injektion (Abb.3C) hat die Zahl der granulopoetischen Zellen wieder deutlich zugenommen. Das Knochenmark zeigt ein Vorwiegen unreifzelliger Elemente mit hellem Kern. Es ergibt sich jetzt also ein Bild der Linksverschiebung.

A



B



C

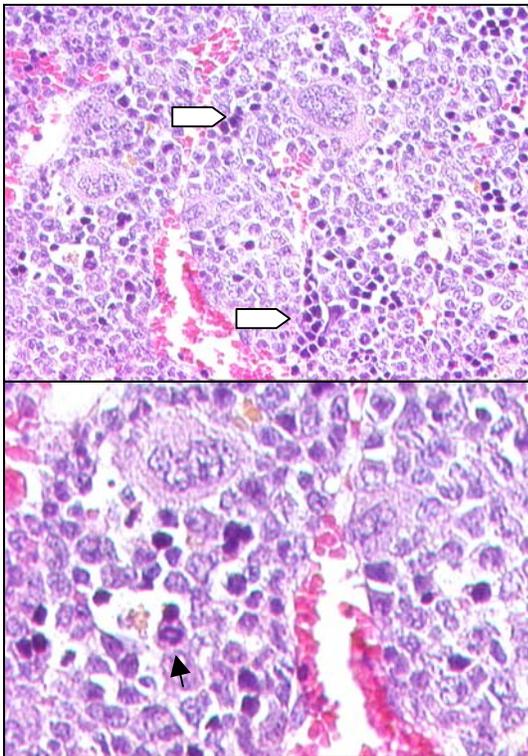


Abb. 3: CpG ODN verursachen transiente Veränderungen in Knochenmarkshistologie.

Histologie aus den Lendenwirbelkörpern von unbehandelten (A), drei (B) oder sechs (C) Tage vor Entnahme mit CpG ODN injizierten Mäusen. Auffallend ist eine deutliche Abnahme der Gesamtzellularität drei Tage nach Injektion, sowie Veränderungen der Zahl erythroider Vorläuferzellen in Erythra ( $\square \rightarrow$ ), die drei Tage nach Injektion ihr Minimum erreichen. Zum selben Zeitpunkt wird braunes Pigment in Knochenmarksmakrophagen sichtbar ( $\Rightarrow$ ), die Zellen der Granulopoese sind uniform reif, erkennbar an ringförmigen oder kondensierten Nuklei (reife Zellen  $\rightarrow$ ). Am sechsten Tag nach Injektion sind diese Zellen vorwiegend unreif mit hellen, wenig kondensierten Nuklei.

## 4.4. Durchflusszytometrisch fassbare Veränderungen im Knochenmark

Um die in der Histologie optisch verifizierten Veränderungen im Knochenmark zu quantifizieren, bietet sich die Analyse der Knochenmarkszellen nach exprimierten Oberflächenmarkern an. Es lassen sich nach Lyse reifer Erythrozyten PMN und ihre Vorläufer anhand der hohen Expression von CD11b/Mac1 und Gr-1 (Lagasse, Weissman 1996), Vorläufer von Erythrozyten anhand des Markers TER-119 (Kina, Ikuta 2000), und dendritische Zellen mit der Färbung von CD11c nachweisen. Es ist allerdings bisher kein Oberflächenmarker bekannt, der die zweifelsfreie Identifizierung von DZ-Vorläuferzellen im Knochenmark ermöglichen würde.

### 4.4.1 Gesamtzellularität

Bezüglich der Gesamtzellularität zeigte sich ein auf 5%-Niveau signifikanter Abfall 1 und 3 Tage nach der Behandlung mit CpG-ODN (Abb.4A). Diese Beobachtung bestätigt die histologischen Befunde.

### 4.4.2 Erythropoese

Nach Präparation der Knochenmarkszellen und Bestimmung der Gesamtzellularität (s.o.) wurde die Zahl der Erythrozyten-Vorläuferzellen durch Färbung mit dem Antikörper TER-119 bestimmt (Abb.4B). Es zeigte sich eine signifikante Abnahme bereits 24 Stunden nach der Injektion mit CpG ODN, die drei Tage nach Injektion noch nachzuweisen war. Am letzten untersuchten Zeitpunkt, sechs Tage nach Injektion, unterschieden sich die Zahlen nicht mehr signifikant von der Kontrolle.

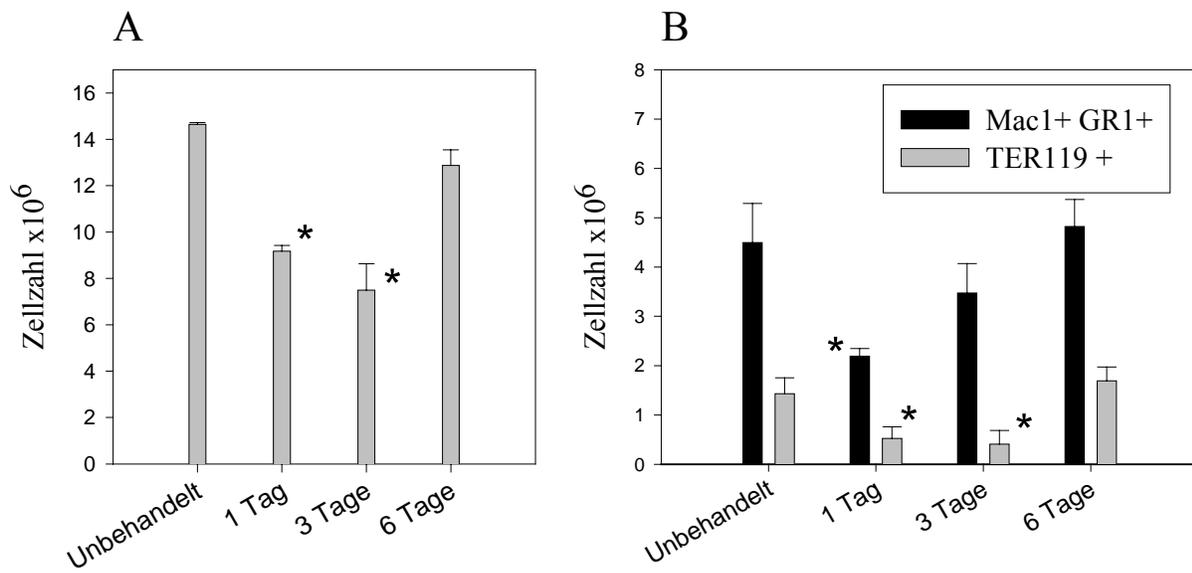
### 4.4.3 Granulopoese

Auch die Zahl der nach Lagasse identifizierten granulopoetischen Zellen fiel 24 Stunden nach der Injektion signifikant (Abb.4B, sowie Lagasse, Weissman 1996). Tendenziell stieg die Zellzahl bis 72 Stunden nach Injektion wieder, erreichte jedoch erst 6 Tage nach Injektion wieder das Niveau der Kontrolltiere (Unterschied Kontrolle – 3 Tage nach Injektion war in diesem

Experiment nicht, in anderen jedoch sehr wohl auf 5%- Niveau signifikant). Diese Beobachtungen decken sich für beide Zellreihen mit den Ergebnissen der Histologie.

#### 4.4.4. Dendritische Zellen

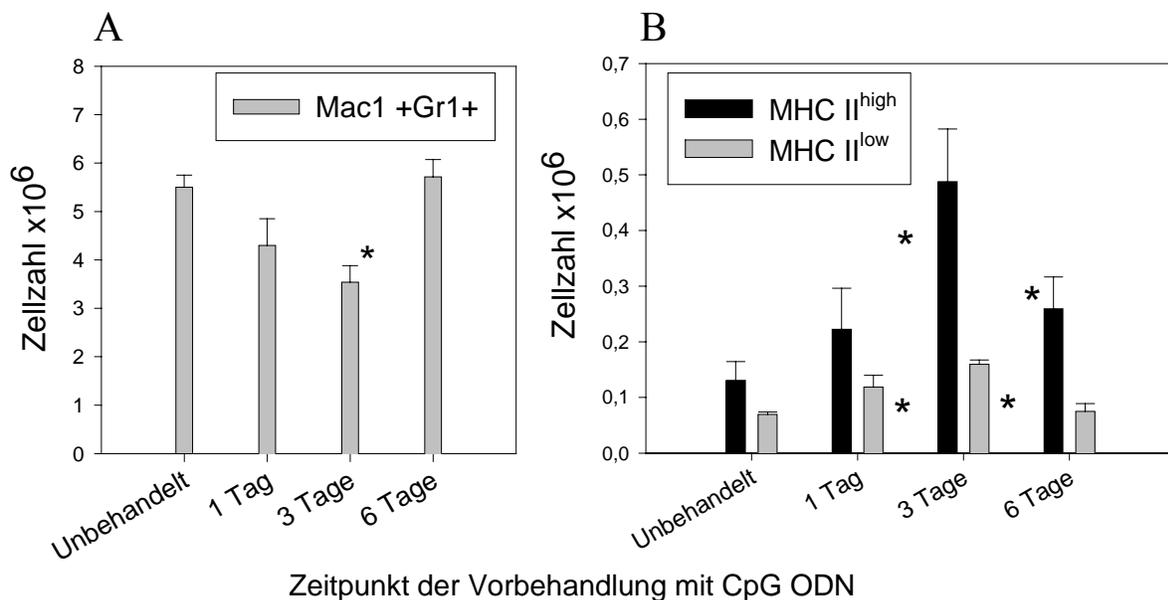
Es wurde versucht, analog den Peritonealzellfärbungen, dendritische Zellen im Knochenmark durch Färbung mit anti-CD11c nachzuweisen. Die Gesamtzahlen stellten sich allerdings als äußerst gering heraus, so dass bei deutlichen interindividuellen Schwankungen keine Aussage aus diesen Färbungen abgeleitet werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt).



**Abb.4: CpG ODN verursachen transiente Veränderungen der Knochenmarks-zusammensetzung.** Jeweils 2 weibliche Balb/C Mäuse wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit CpG ODN intraperitoneal injiziert. Knochenmark wurde aus beiden Femurknochen ausgespült, reife Erythrozyten mit Ammoniumchlorid lysiert, und die erhaltene Zellsuspension mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. A: Gesamtzellzahl zweier Femurknochen, B: PMN und – Vorläuferzellen (Mac1+Gr1+), erythroide Vorläuferzellen (TER119+). (\* Unterschied zur Kontrolle auf 5%-Niveau signifikant)

## 4.5. Ergebnisse der Knochenmarkszellkultur

Wie von de Haan beschrieben, lassen sich Funktionsänderungen des Knochenmarks nicht alleine durch Analyse von Zellzahlen in einem präzisen Moment analysieren, da die Produktionskapazität dieses Organs nicht nur von den Zellzahlen einer bestimmten Reihe, sondern auch von der Geschwindigkeit der Differenzierung und der Apoptoserate abhängt (de Haan, Dontje 1996). Um mehr Information über die Zahl von Vorläuferzellen von dendritischen Zellen und PMN in einem bestimmten Differenzierungsstadium zu gewinnen, eignet sich die Kultur von Knochenmarkszellen mit GM-CSF (Kolonie-stimulierendem Faktor Granulozyten-Makrophagen) als Wachstumsfaktor, der responsive Zellen zur Proliferation und Differenzierung bringt, und die Ausbeute an reifen PMN oder dendritischen Zellen zu quantifizieren erlaubt. Zu diesem Zweck wurde eine Zellfraktion (1/40) der aus zwei Femurknochen gewonnenen Zellen in Abwandlung eines Protokolls zur Gewinnung von dendritischen Zellen für sechs Tage mit GM-



**Abb.5: Wachstum differenzierter Zellen in Knochenmarkskultur mit GM-CSF.** 2 Mäuse pro Gruppe wurden mit CpG ODN zum bezeichneten Zeitpunkt vorbehandelt, Knochenmark wie oben beschrieben entnommen, und 1/40 der gewonnenen Zellen mit GM-CSF für 6 Tage kultiviert. Unter den gewonnenen Zellen wurden mit FACS-Färbung mit Mac1/Gr1 die PMN (A) bzw. mit CD11c die dendritischen Zellen (B) quantifiziert. Letztere lassen sich in reife (MHCII high) und unreife (MHC II low) DZ differenzieren. Es zeigt sich eine vermehrte Produktion beider Arten von CD11c+-Zellen nach Behandlung mit CpG ODN, während die Produktionskapazität für neutrophile Granulozyten 3 Tage nach Behandlung vermindert ist.

(\* Unterschied zur Kontrolle auf 5%-Niveau signifikant )

CSF kultiviert (Inaba, Inaba 1992). Es wurde angenommen, dass in der Kultur keine nennenswerte Phagozytoseaktivität stattfindet, so dass die erhaltene Zellzahl direkt abhängig von der Zahl der eingesetzten Vorläuferzellen und deren mitotischer Aktivität ist.

#### **4.5.1. PMN**

Es wurde analog der in der Peritonealhöhle vorgefundenen Ansammlung von PMN eine Steigerung der Produktionskapazität für PMN erwartet. Die Ergebnisse für die Granulozytenkultur überraschten in der Hinsicht, dass die Knochenmarkszellen der Mäuse, die drei Tage vor Anlage der Kultur mit CpG ODN behandelt wurden, eine signifikant geringere Zahl Mac1/GR-1 positiver Zellen produzieren konnten, als die Kontrollmäuse (Abb.5A). Diese Fähigkeit war jedoch nach 6 Tagen wieder unverändert.

#### **4.5.2. Dendritische Zellen**

Für die CD11c-positiven DZ ergibt sich jedoch ein umgekehrtes Bild. Die Vorbehandlung mit CpG ODN resultiert in einem signifikant höheren Ertrag an CD11c-positiven Zellen in der Kultur, dies gilt für MHC II-niedrig exprimierende, unreife DZ und MHC II-hoch exprimierende Zellen. Interessanterweise erreicht dieser Effekt drei Tage nach der Behandlung sein Maximum, zum Zeitpunkt der niedrigsten Knochenmarkszellularität, und zum Zeitpunkt der niedrigsten Produktionskapazität für PMN.

## 4.6. Einfluss von CpG ODN im Chemotherapiemodell

### 4.6.1. PMN

Da die Kulturergebnisse bezüglich der PMN der erwarteten Produktionssteigerung widersprachen, versuchten wir eine in-vivo Abschätzung der Produktion von PMN.

Es hatte sich in der Kultur zwar bereits gezeigt, dass die Produktionskapazität des Knochenmarks der Knochenmarkszellen für PMN durch die Behandlung mit CpG ODN nicht zunahm. Da die verwendete Zellkultur mit einem Zytokin jedoch nur Vorläuferzellen ab einem relativ hohen Differenzierungsgrad zur Proliferation anregt, und nicht zur Abschätzung der Differenzierungsgeschwindigkeit geeignet ist, wurde als in-vivo- Modell die Neutropeniedauer nach Chemotherapie gewählt. Zusätzlich zur wissenschaftlichen Erkenntnis besitzt dieses Modell durch Nähe zur klinischen Situation einer Chemotherapie auch Aussagekraft bezüglich einer möglichen therapeutischen Verwendung von CpG ODN.

Zu diesem Zweck wurde das bei Mäusen gut etablierte Modell mit dem Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU) gewählt. Wir behandelten eine Gruppe von 4 Mäusen 24h nach Injektion des Zytostatikums mit CpG ODN. Eine Kontrollgruppe erhielt PBS statt CpG ODN, und eine Gruppe erhielt kein Zytostatikum und kein CpG ODN (Abb.6).

Die verwendete Methodik zeigte bei unbehandelten Mäusen geringe zeitliche Schwankungen der Granulozytenzahlen im peripheren Blut, die jedoch in Bezug auf die Absolutzahlen nicht bedeutend waren, und die Interpretation der Behandlungsfolgen nicht erschweren.

Infolge der Behandlung mit 5-FU fielen die Granulozytenzahlen bis zum 6. Tag nach Behandlung auf Null.

Eine zusätzliche Gabe von CpG ODN bewirkte einen verfrühten Abfall der PMN-Zahlen im peripheren Blut, der bereits am 4. Tag zu einem signifikanten Unterschied führte. Allerdings ist auch der Wiederanstieg aus neugebildeten PMN deutlich beschleunigt (Abb.6A), wie anhand von Überlegungen bereits vermutet wurde.

### 4.6.3 Thrombozyten

Bei Messung der Thrombozyten im peripheren Blut fielen die mit 5-FU und CpG ODN behandelten Mäuse durch eine frühe Thrombopenie bereits 48 Stunden nach Injektion von CpG

ODN auf (Abb.6B). Dieser Effekt wurde bereits ohne Chemotherapie beobachtet (Abb.2C). Im Vergleich zu den nur mit 5-FU behandelten Tieren zeigte sich aber auch ein auf 5% Niveau signifikanter, verfrühter erneuter Anstieg, sowie ein tendenziell geringerer Überschuß in der Regenerationsphase nach Tag 7.

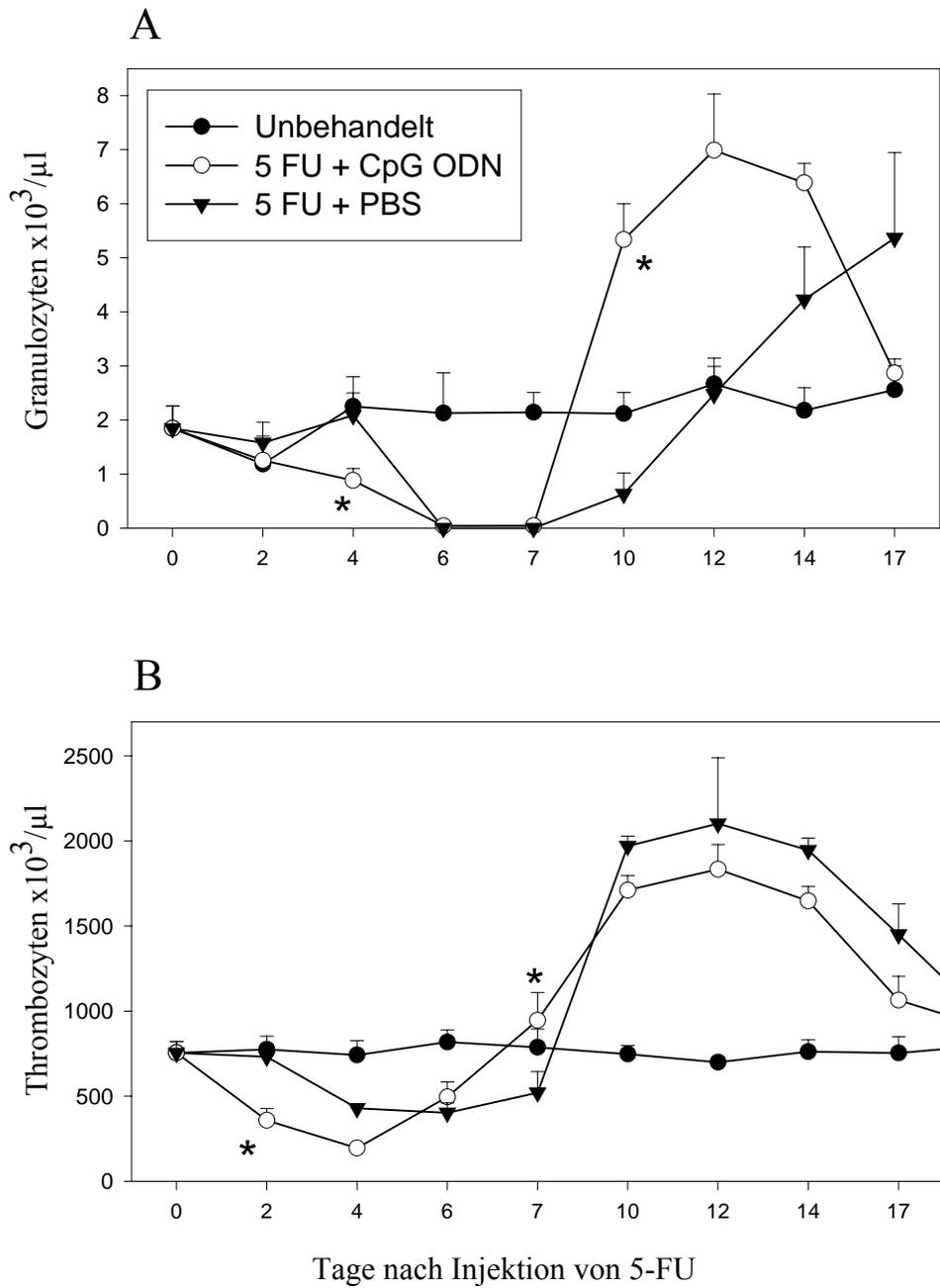


Abb.6: Dauer der Neutropenie im Chemotherapiemodell in Abhängigkeit von der Behandlung mit CpG-ODN. 3 Mäuse pro Gruppe wurden Behandlungsgruppen zugeteilt, 5FU wurde am Tag 0, CpG ODN am Tag 1 injiziert. Die Granulozytenzahl wurde aus den Gesamtleukozytenzahlen mittels mikroskopischer Differenzierung am gefärbten Blutausschrieb bestimmt. (\* Unterschied zwischen 5FU + CpG ODN und 5-FU + PBS behandelten Kontrolle auf 5%-Niveau signifikant)

## 5. Diskussion

CpG ODN als PAMP bewirken eine ausgeprägte Stimulation des Immunsystems mit Aktivierung von Zellen des adaptiven, sowie des angeborenen Immunsystems. In einer Chemotherapiesituation mit Suppression sowohl der Zellularität, als auch der Aktivität beider Komponenten des Immunsystems wäre ein solcher Effekt von großem Interesse.

Die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Einwanderung von PMN in die Peritonealflüssigkeit (Abb.1A) zeigen, dass nach einer Injektion von CpG eine aseptische Entzündungsreaktion mit Verbrauch neutrophiler Granulozyten abläuft. Dies scheint für die meisten Injektionsstellen Gültigkeit zu haben: ein ähnlicher Influx wurde nach einer Injektion von CpG in Gelenke und Muskel bereits beschrieben (Deng, Tarkowski 2000; Takeshita, Takeshita 2000).

Weiterhin fällt dabei auf, dass der Influx erst mehr als 24 Stunden nach der Injektion einsetzt. Diese zeitliche Verzögerung wird auch nach einer Injektion von LPS beobachtet, wobei wohl dem LPS-Rezeptor TLR-4 eine tragende Rolle bei der Verzögerung zukommt (Haziot, Hijiya 2001).

Ein möglicher Mechanismus der Attraktion von PMN könnte die Induktion von Makrophagen-inhibierendem Protein- (MIP)-2, einem Chemokin aus der CXC-Familie sein, welches von murinen Makrophagen nach CpG-Exposition gebildet wird, (Takeshita, Takeshita 2000) und welches einen ausschließlich neutrophilen Zellinflux bedingt (McColl, Clark-Lewis 1999; Raghavan, Nystrom 2003).

Die Blutbildveränderungen, besonders Lympho- und Thrombozytopenie (Abb.2), lassen sich durch die Wirkung zweier Zytokine erklären:

Eines davon ist Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), welches beschriebenermaßen nach Administration von CpG ODN im Blut von Mäusen nachweisbar wird (Lipford, Sparwasser 1997). Dieses Zytokin wird mit der Pathogenese des septischen Schocks, der eine systemische Entzündungsreaktion mit Verbrauch von Thrombopenie und Versagen der Blutgerinnung ist, in engen Zusammenhang gebracht (Jesmok, Lindsey 1992; Mukaida, Ishikawa 1996). Eine experimentelle Verabreichung dieses Zytokins verursacht eine Thrombozytopenie (Senaldi, Piguet 1998).

Ein Zusammenhang mit der CpG-ODN induzierten Thrombozytopenie erscheint daher wahrscheinlich.

Die kurzzeitige Abwesenheit lymphozytärer Zellen im peripheren Blut ist möglicherweise durch die Wirkung von Interferonen bedingt, deren Synthese bei Applikation von CpG ODN bereits auf zellulärer Ebene nachgewiesen wurde, hauptsächlich durch sogenannte plasmazytoide dendritische Zellen (Schnurr, Toy 2003; Hochrein, Shortman 2001). So ist gezeigt, dass eine systemische Applikation von Interferon eine Redistribution sogenannter naiver Lymphozyten (Zellen, die noch keine Kontakt mit dem passenden Antigen hatten) vom Blut in die Lymphknoten zur Folge hat (Westermann, Persin 1994; Gresser, Guy-Grand 1981). Andere in unserem Institut konnten in auf diese Beobachtung folgenden Experimenten zeigen, dass 24 Stunden nach Injektion von CpG ODN eine Zunahme der Lymphozytenzahl in Lymphknoten folgt, die nicht direkt mit der injizierten Substanz in Kontakt kommen (Daten in Veröffentlichung).

Die im Knochenmark gleichzeitig pathohistologisch und durch FACS-Analyse gezeigten Veränderungen sind schwieriger zu interpretieren. Bei peripherem Verbrauch von PMN, wie im Falle einer schweren bakteriellen Infektion oder Sepsis, erwartet man in der histologischen Analyse eine sogenannte Linksverschiebung hin zu einer Dominanz unreifer Elemente der Granulozytopenese mit Hyperplasie (vermehrter Zellularität) der granulozytären Reihe (Routinebefunde hämatologischer Diagnostik). Kontrovers dazu findet sich am dritten Tag nach Injektion von CpG ODN, bei der ebenfalls ein peripherer Granulozytenverbrauch stattfindet (s.o.), pathologisch-histologisch eine Rechtsverschiebung hin zu reiferen Zellen der Granulopoese, und insgesamt eine geringere Zellularität (Abb.3, Abb.4A). Sechs Tage nach Injektion zeigt sich dann mit der Linksverschiebung die erwartete Veränderung des Knochenmarks.

Diese Veränderungen des Knochenmarks könnten nicht ohne Grund als eine toxische direkte oder indirekte Wirkung von CpG ODN auf schnell proliferierende, unreife Vorstufen der Granulopoese und folgende Depletion unreifer Elemente im Knochenmark gedeutet werden.

Es spricht jedoch einiges für eine andere Erklärung. Andere in unserem Labor konnten zeigen, dass nur Stunden nach Applikation von CpG ODN bei Mäusen im peripheren Blut eine kurzdauernde Neutrophilie auftritt (Daten in Veröffentlichung). Diese Veränderung lässt eine Mobilisierung der Reserven an neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark vermuten,

wohl hin zum Ort der Injektion, dem Peritoneum, wo PMN ja bereits früh nachgewiesen wurden (s.o.).

Werden die Mäuse nur mit CpG ODN behandelt, ist jedoch die Bildung von PMN noch gewährleistet, da sich bei diesen Tieren keine Neutropenie nachweisen lässt (Daten nicht gezeigt)- das lässt die Theorie einer Knochenmarksschädigung durch CpG ODN unwahrscheinlich erscheinen.

Wird das Knochenmark jedoch durch 5FU geschädigt, ist eine Neubildung von PMN nicht mehr möglich, und die peripheren Granulozytenzahlen fallen verfrüht ab (Abb.6A).

Aus dieser Mobilisation folgt eine reduzierte Zellularität des Knochenmarks, v.a. ein Verlust von PMN, welcher histologisch (Abb.3) und auch quantitativ mit FACS-Analyse (Abb.4A und B) gezeigt werden konnte.

Gleichzeitig ergeht offenbar ein Impuls zu beschleunigter Differenzierung an die granulopoetischen Zellen im Knochenmark. Dieser zeigt sich histologisch 3 Tage nach Injektion in einem Vorherrschen reiferer Zellen (Abb.3). Zusätzlich ist im Versuch mit 5-FU zweifelsfrei zu sehen, dass durch CpG ODN die Differenzierung von PMN im Knochenmark beschleunigt wird (Abb.6A). Nachdem alle proliferierenden Zellen durch das Zytostatikum abgetötet wurden, erscheinen neugebildete neutrophile Granulozyten erst im Blut, nachdem die Differenzierung von einer 5-FU resistenten, ruhenden Stammzelle aus durchlaufen wurde. Bis zum Erscheinen neugebildeter PMN sind die Reserven an PMN im Blut längst verbraucht, es resultiert ein zeitweiliger Mangel an neutrophilen Granulozyten. Die Dauer der Neutropenie ist somit ein Maß für die Differenzierungsgeschwindigkeit.

Dem gesteigerten Bedarf an neutrophilen Granulozyten nach CpG ODN-Behandlung trägt also die beschleunigte Differenzierung der Vorläufer im Knochenmark Rechnung.

Einige methodische Überlegungen sind zur Einbeziehung der Ergebnisse der Knochenmarkskultur mit GM-CSF nötig. Prinzipiell werden in der Knochenmarkskultur mit GM-CSF relativ differenzierte Vorläuferzellen, die sogenannten Kolonie-bildende Einheiten – Granulozyten oder – Granulozyten-Makrophagen (CFU-G oder CFU-GM), zur Zellteilung und Differenzierung angeregt. Um noch unreifere Vorläuferzellen zu stimulieren, wäre der Einsatz einer Mischung mehrerer Zytokine nötig (Kriegler, Verschoor 1994). Demzufolge sind CFU-G, CFU-GM, oder noch reifere Vorläuferzellen für die Ausbeute der Knochenmarkskultur mit GM-CSF verantwortlich.

In den hier gezeigten Experimenten mit Knochenmarkskulturen zeigt sich, dass durch CpG ODN-Vorbehandlung die Ausbeute an reifen PMN abnimmt (Abb.5A). Daraus folgt, dass entweder die Zahl der responsiven CFU-G oder -GM im Knochenmark der behandelten Mäuse geringer ist, oder deren Potential zur Zellteilung. Kriegler et al. Beschreiben beispielsweise, dass hämatologische Vorläuferzellen mit zunehmender Differenzierung proliferatives Potential verlieren (Kriegler, Verschoor 1994).

In der Zusammenschau der Ergebnisse ist die Folgerung naheliegend, dass die GM-CSF-responsiven Zellen entweder verbraucht werden, und daher in kleinerer Zahl vorliegen, oder durch beschleunigte Differenzierung weniger Zeit zur Proliferation für diese Zellen verbleibt.

Es ist anzunehmen, dass die durch CpG ODN induzierten Zytokine eine wesentliche Rolle spielen. Nach Lipford et al. werden durch CpG ODN einige hämatologisch aktive Zytokine in relevanten Mengen sezerniert, unter anderem IL-1, IL-6 und IL-12 (Lipford, Sparwasser 1997). IL-1 und IL-6 zeigen bekanntermaßen beschleunigende Wirkung auf die Granulopoese (Kovacs, Kerr 1998; Takatsuki, Okano 1990), während IL-12 eine Reduktion der Zahl von CFU-GM im Knochenmark und die Induktion extramedullärer Hämatopoese bewirkt (Jackson, Yan 1995). Die Konsequenzen der Wirkungen dieser Zytokine sind also vereinbar mit den Ergebnissen der Knochenmarkszellkultur.

Zusätzlich zeigen die vorgestellten Ergebnisse, dass CpG ODN im Knochenmark zum Verschwinden der Vorstufen roter Blutkörperchen führen (Abb.3B, Abb 4B). Gleichzeitig in den Knochenmarksmakrophagen auftauchendes Eisenpigment legt eine stattgehabte Phagozytose dieser Zellen nahe. Die Erythropoese wird jedoch nicht dauernd unterdrückt, sondern offenbar in die Milz verlagert: Sparwasser et al. zeigten bereits, dass CpG ODN- Behandlung zum Auftauchen von hämatologischen Vorläuferzellen in der Milz führen (Sparwasser, Hultner 1999). Dabei sind frühe erythroide Vorläuferzellen (sogenannte Burst Forming Units – Erythroid, BFU-E), nachgewiesen worden.

Sechs Tage nach einer einmaligen Injektion von CpG ODN sind auch wieder erythroide Vorläuferzellen in normalen Zahlen im Knochenmark nachzuweisen (Abb.3C, Abb.4B), was auf einen relativ kurzdauernden Effekt schließen lässt. Die Vermutung liegt nahe, dass sich bei kontinuierlicher Administration des proinflammatorischen Stimulus eine ausgedehntere Erythropoese in der Milz bilden würde, wie bereits für Applikation von G-CSF gezeigt (Molineux, Pojda 1990).

Auch hier bieten sich einige zugrundeliegende Mechanismen zur Erklärung an: Nach Lipford et al. wird durch CpG ODN Sekretion von IL-12 getriggert (Lipford, Sparwasser 1997). Dieses Zytokin könnte die extramedulläre Hämatopoese mit auslösen. Eine experimentelle Verabreichung dieses Zytokins verursacht in den behandelten Mäusen (wie bei Behandlung mit CpG) das Auftauchen hämatologischer Vorläuferzellen in der Milz, interessanterweise zeitgleich mit einer Reduktion der Zahl von CFU-GM im Knochenmark (Jackson, Yan 1995). Dies halten wir angesichts der Knochenmarkskulturergebnisse auch hier für möglich (s.o.).

Auch für G-CSF wurde bereits die Induktion extramedullärer Hämatopoese gezeigt, gleichzeitig mit einer Suppression der Erythropoese im Knochenmark (Molineux, Pojda 1990). Interessanterweise scheint bei Mäusen die Milz bei längerdauernder Applikation von G-CSF zum Ort der Erythropoese zu werden, da splenektomierte Mäuse nach Applikation von G-CSF anämisch werden (Molineux, Pojda 1990).

Das Verschwinden von roten Vorläuferzellen im Knochenmark könnte in unseren Versuchen durch eine TNF- $\alpha$ - abhängige Erythrophagozytose bedingt sein, wie in anderen Modellen bereits demonstriert (Clark, Chaudhri 1988).

Zusammenfassend kann man die Veränderungen im Knochenmark auf die Injektion von CpG ODN so interpretieren: der inflammatorische Stimulus führt zu einer Mobilisation der im Knochenmark gespeicherten, relativ reifen PMN hin zum Ort des Verbrauchs. Daraus erfolgt die reduzierte Zellularität des Knochenmarks. Signale führen zu einer beschleunigten Differenzierung der unreifen Vorstufen von PMN unter Verbrauch von Vorläuferzellen.

Gleichzeitig bewirkt der proinflammatorische Stimulus eine Verminderung der Erythropoese im Knochenmark. Die Erythropoese wird in die Milz verlagert, im Knochenmark herrscht infolgedessen mehr Raum für die Granulopoese. Es ergibt sich somit ein Gesamtbild einer Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus, welche auf verschiedenen Stufen der Zelldifferenzierung ansetzt.

Auch Migration und Produktion von dendritischen Zellen (DZ) wird diesem Stimulus entsprechend verändert. In der Peritonealflüssigkeit zeigt sich bereits einen Tag nach der Injektion ein komplettes Fehlen von MHCII hoch exprimierenden, CD11c-positiven DZ in der Peritonealflüssigkeit (Abb.1B). Diese Zellen werden als mature dendritische Zellen klassifiziert (Sparwasser, Koch 1998).

Im Kontrast zur Peritonealflüssigkeit nimmt die Gesamtzahl von DZ im lokalen, drainierenden Lymphknoten bereits 24h nach Injektion um das 20-fache des Ausgangswerts zu, wie von Lipford et al. beschrieben (Lipford, Sparwasser 2000). Es handelt sich dabei wahrscheinlich unter anderem um eine Einwanderung von DZ, die vorher durch die CpG-abhängige Aktivierung im Gewebe zur Maturation gebracht wurden. Von anderen konnte bereits gezeigt werden, dass Zytokin-stimulierte DZ eine beschleunigten Wanderung in die lokalen Lymphknoten ausführen (Kobayashi, Miura 2004). Analog gehen wir bei dem hier beschriebenen Fehlen maturer DZ in der Peritonealflüssigkeit 24h nach Injektion von einer Auswanderung dieser Zellen in die lokalen Lymphknoten aus.

72 Stunden nach Injektion ist ein massiver Influx CD11c-positiver, MHCII niedrig exprimierender und damit unreifer DZ in die Peritonealhöhle zu verzeichnen, der am ehesten einer in Reaktion auf den proinflammatorischen Stimulus neugebildeten Zellpopulation entspricht. 6 Tage nach Injektion hat dann bereits eine Reifung stattgefunden: Die in der Gesamtzahl nicht veränderte Population von CD11c-positiven DCs besteht etwa zur Hälfte aus maturen Zellen.

Diese Ereignisse lassen sich funktionell folgendermaßen interpretieren: unreife DZ, die MHCII niedrig exprimieren, weisen eine deutlich höhere Phagozytoseaktivität auf, als mature DZ, und verarbeiten phagozytiertes Antigen (Sparwasser, Vabulas 2000). Dieser Zelltyp wird also am Ort einer vermeintlichen Infektion gebraucht, um vorhandenes Fremdmaterial aufzunehmen. Enthält das aufgenommene Material die erwähnten PAMP-Strukturen, z.B. DNA mit CpG-Motiven, erfolgt eine Aktivierung der DZ, und damit eine Funktionsänderung zur Antigen-Präsentierenden Zelle, die eine potente Immunreaktion induzieren kann.

Im vorliegenden Fall induziert also CpG ODN als PAMP einen Influx dieser Zellart an den Ort einer vermeintlichen Infektion. Es ist äußerst fraglich, ob die folgende Reifung der DZ noch durch das injizierte CpG ODN selbst verursacht wird, da dieses Molekül bereits nach 24 Stunden fast vollständig ausgeschieden ist (unpublizierte Daten).

In der Knochenmarkskultur lassen sich simultan Änderungen der Produktionskapazität von DZ nachweisen (Abb.4b). Das Knochenmark ist bereits 24h nach Injektion von CpG ODN derart verändert, dass sich eine erhöhte Produktion dieser Zellen in Kultur mit GM-CSF möglich ist. Diese Veränderung ist gleichsinnig mit dem erhöhten peripheren Verbrauch. Es ist wahrscheinlich, dass auch diese Knochenmarksveränderungen durch die Ausschüttung von Zytokinen in der frühen Phase nach Injektion von CpG ODN mitverursacht werden.

Analog zu den PMN zeigt sich hier bei knochenmarksabgeleiteten dendritischen Zellen eine Reaktion des produzierenden Organs auf erhöhten Verbrauch.

In der Zusammenschau der Ergebnisse zeichnet sich ein möglicher Nutzen von CpG ODN in einer Chemotherapie-Situation ab. Es besteht Anlass zur Hoffnung, dass auch bei menschlichen Patienten diese Effekte reproduzierbar sind. Dabei wäre nicht nur eine schnellere Erholung von der Neutropenie während der Chemotherapie interessant, sondern auch die unspezifisch immunstimulierenden Eigenschaften von CpG ODN, deren möglicher Nutzen in einer Infektionssituation hier nicht untersucht wurde.

Als weitere interessante Eigenschaft zeigt sich die Möglichkeit zur lokalen Attraktion von immunkompetenten Zellen durch CpG ODN, die schon von Weighardt beschrieben wurde, und hier erstmals für DZ außerhalb eines Lymphknotens beschrieben wurde (Weighardt, Feterowski 2000).

## 6. Zusammenfassung

CpG ODN sind Moleküle, die in der DNS von Wirbeltieren nicht vorkommen. Das Immunsystem nützt diese und andere Molekülstrukturen (PAMP) zur Erkennung von Fremdorganismen, und reagiert darauf mit Aktivierung. Bisher war bekannt, daß CpG ODN am Ort der Injektion eine Akkumulation von neutrophilen Granulozyten verursachen, sowie eine Einwanderung von dendritischen Zellen in den lokalen Lymphknoten auslösen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben den neutrophilen Granulozyten auch unreife dendritischen Zellen an den Ort der Injektion einwandern, was bisher für nicht-lymphatisches Gewebe unbekannt war. Mit der Zeit erhöht sich der Anteil von reifen DZ an dieser Population, was mit der erwarteten Reifung dieser Zellen vereinbar ist.

Analog des Verbrauchs dieser zwei Zelltypen reagiert das Knochenmark mit Veränderungen, die die kurzzeitige Produktionskapazität für diese Zellen erhöhen. Zum Einen wird die Reifungszeit von neutrophilen Granulozyten verkürzt. Auch für die knochenmarksabgeleiteten dendritischen Zellen erhöht das Knochenmark infolge von CpG-Administration die Produktionskapazität, wahrscheinlich, indem eine größere Anzahl von Vorläuferzellen zur Verfügung gestellt werden.

Somit werden zwei verschiedene Mechanismen des Knochenmarks sichtbar, bei Bedarf eine erhöhte Zellzahl zu produzieren. Es ist anzunehmen, dass hier exemplarisch Veränderungen des Knochenmarks studiert werden können, die auch bei einer bakteriellen Infektion vor sich gehen.

Diese Effekte lassen sich möglicherweise bei der Behandlung von Krebspatienten vorteilhaft einsetzen: die angewandte Chemotherapie führt zu einer Neutropenie mit einem hohen Risiko für lebensbedrohliche Infektionen. Die Dauer dieser Neutropenie ließe sich analog dem Mausmodell mit CpG ODN wahrscheinlich verkürzen.

Auch im Falle anderer klinischer Situationen mit hohem Infektionsrisiko (z.B. Frühgeborene, septische Chirurgie) könnte eine prophylaktische Gabe von CpG ODN mit folgender Aktivierung von Zellen des Immunsystems und gesteigerter Bildung von neutrophilen Granulozyten eine schwere Infektion vermeiden helfen.

## 7. Literatur

Berghmans, T., Paesmans, M., Lafitte, J. J., Mascaux, C. Meert, A.P., Jacquy, C., Burniat, A., Steels, E., Vallot, F., Sculier, J.P.:  
Therapeutic use of granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in febrile neutropenic cancer patients. A systematic review of the literature with meta-analysis  
Support.Care Cancer, 10 (3) 2002 , 181-188

Bird, A.:  
CpG-rich islands and the function of DNA methylation  
Nature, 321 (6067) 1986 , 209-213

Brookes, R., Pathan, A., McShane, H., Hensmann, M., Price, D., Hill, A.:  
CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular Mycobacterium tuberculosis growth in activated human macrophages  
Eur J Immunol., 33 (12) 2003 , 3293-302

Buchsel, P., Forgey, A., Grape, F., und Hamann, S.:  
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: current practice and novel approaches  
Clin J Oncol Nurs, 6 (4) 2002, 198-205

Clark, I. A., Chaudhri, G.:  
Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis  
Br J Haematol., 70 (1) 1988, 99-103

de Haan, G., Dontje, B., und Nijhof, W.:  
Concepts of hemopoietic cell amplification. Synergy, redundancy and pleiotropy of cytokines affecting the regulation of erythropoiesis  
Leuk.Lymphoma., 22 (5-6) 1996, 385-394

Deng, G., Tarkowski, A.:  
The features of arthritis induced by CpG motifs in bacterial DNA  
Arthritis Rheum., 43 (2) 2000 , 356-64

Gimmi, C., Freeman, G., Gribben, J., Sugita, K., Freedman, A., Morimoto, C., Nadler, L.:  
B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2  
Proc Natl Acad Sci U S A., 88 (15) 1991 , 6575-9

Girard, R., Pedron, T., Uematsu, S., Balloy, Chignard, M., Akira, S., Chaby, R.:  
Lipopolysaccharides from Legionella and Rhizobium stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2  
J Cell Sci, 116 (Pt 2) 2003 , 293-302

Gresser, I., Guy-Grand, D., Maury, C., und Maunoury, T.:  
Interferon induces peripheral lymphadenopathy in mice  
J Immunol., 127 (4) 1981 , 1569-75

Haziot, A., Hijiya, N., Gangloff, S. C., Silver, J., Goyert, M.:  
Induction of a novel mechanism of accelerated bacterial clearance by lipopolysaccharide in CD14-deficient and Toll-like receptor 4-deficient mice  
J Immunol, 166 (2) 2001 , 1075-8

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K., und Akira, S.:  
The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets  
J Immunol, 15 (6) 2003 , 3059-64

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

Henneke, P., Osmers, I., Bauer, K., Lamping, N., Versmold, H., Schumann, R.:  
Impaired CD14-dependent and independent response of polymorphonuclear leukocytes in preterm infants  
J Perinat Med, 31 (2) 2003 , 176-83

Herold, G.:  
Innere Medizin 2003

Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., O'Keeffe, M.:  
Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets  
J Immunol, 166 (9) 2001 , 5448-55

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., Steinman, R.:  
Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor  
J Exp Med, 176 (6) 1992 , 1693-1702

Jackson, J. D., Yan, Y., Brunda, M. J., Kelsey, L.S., Talmadge, J.E.:  
Interleukin-12 enhances peripheral hematopoiesis in vivo  
Blood, 85 (9) 1995 , 2371-2376

Janeway, C., Travers, P.:  
Immunobiology 1997

Jesmok, G., Lindsey, C., Duerr, M., Fournel, M., Emerson, T.:  
Efficacy of monoclonal antibody against human recombinant tumor necrosis factor in E. coli-challenged swine  
Am J Pathol., 141 (5) 1992 , 1197-207

Junqueira, Carneiro:  
Basic Histology 1995

Kalupahana, R., Emilianus, A., Maskell, D., und Blacklaws, B.:  
Salmonella enterica serovar Typhimurium expressing mutant lipid A with decreased endotoxicity causes maturation of murine dendritic cells  
Infect Immun, 71 (11) 2003 , 6132-6140

Kina, T., Ikuta, K., Takayama, E., Wada, K., Majumdar, A., Weissman, I., Katsura, Y.:  
The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage  
Br J Haematol, 109 (2) 2000 , 280-287

Kobayashi, H., Miura, S., Nagata, H., Tsuzuki, Y., Hokari, R., Ogino, T., Watanabe, C., Azuma, T., Ishii, H.:  
In situ demonstration of dendritic cell migration from rat intestine to mesenteric lymph nodes: relationships to maturation and role of chemokines  
J Leukoc Biol, 75 (3 ) 2004 , 434-42

Kovacs, C., Kerr, J., Daly, B., Evans, M., Johnke, R.:  
Interleukin 1 alpha (IL-1) and macrophage colony-stimulating factor (M- CSF) accelerate recovery from multiple drug-induced myelosuppression  
Anticancer Res, 18 (3A) 1998 , 1805-1812

Krieg, A.:  
CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects  
Annu Rev Immunol., (20) 2002 , 709-760

Krieg, A., Yi, A., Matson, S., Waldschmidt, T., Bishop, G., Teasdale, R., Koretzky, G., Klinman, D.:  
CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation  
Nature, 374 (6522) 1995 , 546-9

Kriegler, A., Verschoor, S., Bernardo, D., und Bertoncello, I.:  
The relationship between different high proliferative potential colony- forming cells in mouse bone marrow  
Exp Hematol, 22 (5) 1994 , 432-440

Lagasse, E., Weissman, I.:  
Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes  
J.Immunol.Methods, 197 (1-2) 1996 , 139-150

Larsen, C., Ritchie, S., Hendrix, R., Linsley, P., Hathcock, K., Hodes, R., Lowry, R., Pearson, T.:  
Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells  
J Immunol, 152 (11) 1994 , 5208-19

Lipford, G., Sparwasser, T., Bauer, M., Zimmermann, S. Koch, E., Heeg, K., Wagner, H.:  
Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful  
cytokines  
Eur.J.Immunol., 27 (12) 1997 , 3420-3426

Lipford, G., Sparwasser, T., Zimmermann, S., Heeg, K., Wagner, H:  
CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition  
to antigen-driven responses  
J.Immunol., 165 (3) 2000 , 1228-1235

Lotz, S., Aga, E., Wilde, I., Van Zandbergen, G., Hartung, T., Solbach, W., Laskay, T.:  
Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous  
apoptosis via CD14 and TLR2  
J Leukoc Biol., 75 (3 ) 2004 , 467-77

McColl, S.,Clark-Lewis, I.:  
Inhibition of murine neutrophil recruitment in vivo by CXC chemokine receptor antagonists  
J Immunol., 163 (5) 1999 , 2829-35

Means, T., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M., Golenbock, D., Luster, A.,:  
Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and  
TLR9  
J Clin Invest, 115 (2) 2005 , 407-417

Molineux, G., Pojda, Z., und Dexter, T.:  
A comparison of hematopoiesis in normal and splenectomized mice treated with granulocyte  
colony-stimulating factor  
Blood, 75 (3) 1990 , 563-9

Moynihan, J.,Cohen, N.:  
The kinetics of recovery of leukocyte number and lymphocyte function following an injection of  
a single high dose of cyclophosphamide in C3H/HeJ mice  
Int J Immunopharmacol., 11 (5) 1989 , 517-527

Mukaida, N., Ishikawa, Y., Ikeda, N., Fujioka, N., Watanabe, S., Kuno,K., Matsushima, K.:  
Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock: biochemical analysis of LPS  
receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kappaB and regulation of cytokine  
production/action through beta2 integrin in vivo  
J Leukoc Biol., 59 (2) 1996 , 145-51

Nakano, K., Hayashi, H., Okugawa, K., Furuichi, H., Ido, M., Sohmura, Y.:  
Accelerated recovery of antigen-presenting cell activity by the administration of interleukin 1  
alpha in 5-fluorouracil-treated mice  
Cell Immunol., 136 (1) 1991 , 234-241

Radley, J. M.,Scurfield, G.:  
Effects of 5-fluorouracil on mouse bone marrow  
Br J Haematol., 43 (3) 1979 , 341-51

- Raghavan, S., Nystrom, J., Fredriksson, M., Holmgren, J., Harandi, A.:  
Orally administered CpG oligodeoxynucleotide induces production of CXC and CC chemokines in the gastric mucosa and suppresses bacterial colonization in a mouse model of *Helicobacter pylori* infection  
*Infect Immun.*, 71 (12) 2003 , 7014-22
- Schiemann, M., Busch, V., Linkemann, K., Huster, K., Busch, D.:  
Differences in maintenance of CD8+ and CD4+ bacteria-specific effector-memory T cell populations  
*Eur J Immunol.*, 2003 Oct;33(10) (10) 2003 , 2875-85
- Schnurr, M., Toy, T., Shin, A., Hartmann, G., Rothenfusser, S., Soellner, J., Davis, I., Cebon, J., Maraskovsky, E.:  
Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells  
*Blood*, 103 (4) 2003 , 1391-7
- Senaldi, G., Piguet, P.:  
Mortality and platelet depletion occur independently of fibrinogen consumption in murine models of tumour necrosis factor-mediated systemic inflammatory responses  
*Cytokine*, 10 (5) 1998 , 382-389
- Smeaton, T.:  
Migration of polymorphonuclear neutrophils and macrophages from bone marrow to the peritoneal cavity after (3H)-thymidine labelling of rat tibial bone marrow in vivo  
*Aust J Exp Biol Med Sci.*, 1984 Aug;62 (Pt 4) 1984 , 453-63
- Sparwasser, T., Hultner, L., Koch, E. S., Luz, A., Lipford, G., Wagner, H.:  
Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis  
*J.Immunol.*, 162 (4) 1999 , 2368-2374
- Sparwasser, T., Koch, E. S., Vabulas, R. M., Heeg, K., Lipford, G., Ellwart, J., Wagner, H.:  
Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells  
*Eur.J.Immunol.*, 28 (6) 1998 , 2045-2054
- Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Hacker, H., Heeg, K., Wagner, H.:  
Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock  
*Eur J Immunol.*, 27 (7) 1997 , 1671-9
- Sparwasser, T., Vabulas, R. M., Villmow, B., Lipford, G., Wagner, H.:  
Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins  
*Eur.J.Immunol.*, 30 (12) 2000 , 3591-3597
- Stein, C. , Subasinghe, C., Shinozuka, K., und Cohen, J.:  
Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides  
*Nucleic Acids Res.*, 16 (8) 1988 , 3209-3221

- Steinman, R.:  
Some interfaces of dendritic cell biology  
APMIS, 111 (7-8) 2003 , 675-8
- Stumbles, P., Strickland, D., Pimm, C., Proksch, S., Marsh, A., McWilliam, A., Bosco, A., Tobagus, I., Thomas, J., Napoli, S., Proudfoot, A., Wells, T., Holt, P.:  
Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus  
J Immunol, 167 (1) 2001 , 228-34
- Takatsuki, F., Okano, A., Suzuki, C., Miyasaka, Y., Hirano, T., Kishimoto, T., Ejima, D., Akiyama, Y.:  
Interleukin 6 perfusion stimulates reconstitution of the immune and hematopoietic systems after 5-fluorouracil treatment  
Cancer Res., 50 (10) 1990 , 2885-2890
- Takeshita, S., Takeshita, F., Haddad, D., Ishii, K. J., Klinman, D.M.:  
CpG oligodeoxynucleotides induce murine macrophages to up-regulate chemokine mRNA expression  
Cell Immunol., 206 (2) 2000, 101-6
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S.:  
Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components  
Immunity, 11 (4) 1999 , 443-51
- Umemoto, E., Brokaw, J., Dupuis, M., McDonald, D.:  
Rapid changes in shape and number of MHC class II expressing cells in rat airways after Mycoplasma pulmonis infection  
Cell Immunol., 220 (2) 2002 , 107-15
- Utaisincharoen, P., Anuntagool, N., Chaisuriya, P., Pichyangkul, S., Sirisinha, S.:  
CpG ODN activates NO and iNOS production in mouse macrophage cell line (RAW 264.7)  
Clin.Exp.Immunol., 128 (3) 2002 , 467-473
- Wagner, H.:  
Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity  
Curr Opin Microbiol., 5 (1) 2002 , 62-9
- Walker, W.:  
Role of the mucosal barrier in toxin/microbial attachment to the gastrointestinal tract  
Ciba Found Symp, 112 1985 , 34-56
- Watson, R., Rotstein, O., Nathens, A., Parodo, J., Marshall, J.:  
Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement  
J Immunol., 158 (2) 1997 , 945-53

Weighardt, H., Feterowski, C., Veit, M., Rump, M., Wagner, H., Holzmann, B.:  
Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response  
J.Immunol., 165 (8) 2000 , 4537-4543

Westermann, J., Persin, S., Matyas, J., van der, Meide, P., Pabst, R.:  
Migration of so-called naive and memory T lymphocytes from blood to lymph in the rat. The influence of IFN-gamma on the circulation pattern  
J Immunol., 152 (4) 1994 , 1744-50

Worku, M., Paape, M., Marquardt, W.:  
Modulation of Fc receptors for IgG on bovine polymorphonuclear neutrophils by interferon-gamma through de novo RNA transcription and protein synthesis  
Am J Vet Res, 55 (2) 1994 , 234-8

## Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle in erster Linie meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Herrmann Wagner danken, in dessen Institut diese Doktorarbeit angefertigt werden konnte, der mich dabei unterstützte, und eine Förderung durch das Graduiertenkolleg 333 der deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglichte. Auch möchte ich mich bei Dr. Grayson Lipford bedanken, der mich während der Arbeit betreute, und durch die Vermittlung von Kenntnissen das Interesse an der Materie stets steigerte.

Weiterhin gilt mein Dank dem Betreuer des Graduiertenkollegs 333, Prof. Dr. Manfred Gratzl.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Instituts für Einweisung, Hilfe und Unterstützung, insbesondere bei Herrn Dr. Hochholzer und Herrn PD Dr. Stefan Bauer für die Korrektur des Manuskripts, sowie bei Franziska Amppenberger und Tanja Gellert für technische Unterstützung bei aufwändigeren Experimenten.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir Studium und Promotion ermöglichten, und die Verständnis für meine häufige Abwesenheit zeigten.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Irene Stenzel für die Korrektur des Manuskripts und die Unterstützung bei dessen Verbesserung bedanken.

Vielen, vielen Dank!

Norbert Heinrich