

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

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

**Charakterisierung der Aktivierung von murinen plasmazytoiden  
Dendritischen Zellen nach Stimulation mit CpG-DNA, Resiquimod (R-848)  
und Herpes simplex Virus-1**

Beatrix Schlatter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer  
2. Priv.-Doz. Dr. St. Bauer

Die Dissertation wurde am 23.03.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 02.06.2005 angenommen.



Meinen Eltern



## Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
A	Adenin
Abb	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat (6)] di-Ammonium Salz
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BDCA	<i>Blood dendritic cell antigen</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
ca	circa
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDZ	konventionelle Dendritische Zelle
CpG	Deoxycytidylat-Phosphat-Deoxyguanylat
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsorter
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL-BM DZ	Flt3-Ligand generierte Dendritische Zellen
Flt3-Ligand	Fms-verwandte Tyrosinkinase 3 Ligand
G	Guanin
G418	Neomycin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde
hi	hitzeinaktiviert
HRP	Meerrettich Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HSP60	Hitzeschock-Protein 60
HSV-1	Herpes simplex Virus 1
IFN	Interferon
IFN-α	Interferon alpha
IKK	IκB Kinasekomplex
IL	Interleukin
IPZ	Typ-I Interferon produzierende Zelle
IRAK	IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulierender Faktor
KO	Knock out
konz	Konzentration
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin reiche Regionen ( <i>leucin rich repeats</i> )
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
Mal	<i>MyD88-adaptor-like protein</i>
MALP-2	Mykobakterielles Lipoprotein
MB	Gemischtes Rückgrat ( <i>mixed backbone</i> )
M-CSF	Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor

MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	Viruspartikel pro Wirtszelle ( <i>multiplicity of infection</i> )
mRNA	Boten RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MyD88	myeloider Differenzierungsmarker 88
n	Nano ( $10^{-9}$ )
neg	negativ
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor $\kappa$ B
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
nm	Nanometer
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
OspA	<i>outer surface lipoprotein</i>
p	Piko ( $10^{-12}$ )
Pam3CysK4	(S-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4))
PAMPs	Pathogen assoziierte molekulare Muster
PBMC	Periphere Blut mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PD	Phosphodiester
pDZ	plasmazytoide Dendritische Zelle
PE	Phycoerythin
pfu	Plaque bildende Einheit ( <i>plaque forming unit</i> )
PI	Propidium Jodid
Pi3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKR	ds RNA-aktivierte Serin/Threonin- Proteinkinase
poly (I:C)	Poly-Inosin : poly-Cytidyl-Säure
pos	positiv
POX	Peroxidase
PRR	Muster erkennender Rezeptor
PTO	Phosphothioat
R-848	Resiquimod
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s. S.	siehe Seite
ss	einzelsträngig
T	Thymin
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
TICAM	<i>TIR-containing-adaptor-molecule</i>
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TIRAP	<i>TIR-domain-containing-adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
TPCK	Tosyl-L-phenylalanylchloromethan
TRAF6	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6
TRAM	<i>Trif-related-adaptor-molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing-adaptor-inducing-IFN-<math>\beta</math></i>
u	unit, Einheit
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
WEHI	Walter and Eliza Hall Institute
WM	Wortmannin
WT	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
Inhaltsverzeichnis .....	7
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>11</b>
1.1 Angeborene und erworbene Immunität.....	11
1.2 Toll-like Rezeptoren .....	13
1.2.1 Allgemeines.....	13
1.2.2 MyD88-abhängiger Signalweg .....	14
1.2.3 MyD88-unabhängiger Signalweg .....	15
1.3 Dendritische Zellen.....	16
1.3.1 Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität.....	16
1.3.2 Humane und murine plasmazytoide Dendritische Zellen (pDZ).....	19
1.4. Interferone .....	21
1.5 CpG-ODN.....	23
1.6 Herpes simplex Virus-1 .....	25
1.6 Ziele der Arbeit.....	26
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
2.1. Geräte.....	27
2.2 Reagenzien und Medien.....	28
2.2.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	28
2.2.2 Verwendete CpG-DNA Oligonukleotide.....	28
2.2.3 Medien und Medienzusätze .....	29
2.3 Zellkultur .....	30
2.3.1 Verwendetes Plastik .....	30
2.3.2 Isolierung von murinen Knochenmark .....	31
2.3.3 Bestimmung der Zellzahl .....	32
2.3.4 Generierung von Makrophagen, plasmazytoiden und GM-CSF-DZ .....	32
2.3.5 Stimulationen.....	34
2.3.6 Passagieren von HEK 293 Zellen.....	34
2.4 ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay) .....	35
2.4.1 Prinzip.....	35

2.4.2	Verwendete Materialien .....	36
2.4.3	Durchführung .....	37
2.5	Durchflusszytometrie .....	38
2.5.1	Prinzip der Durchflusszytometrie .....	38
2.5.2	Färbung und Analyse von Zelloberflächenmolekülen .....	39
2.6	Luziferase-Assay .....	41
2.6.1	Prinzip des Luziferase-Assays .....	41
2.6.2	Durchführung .....	41
2.7	Affymetrix Genechip® Array .....	42
2.7.1	Allgemeines Prinzip .....	42
2.7.2	Präparation der Gesamt-RNA .....	42
2.8	Methoden zur Zelltrennung .....	43
2.8.1	MACS .....	43
2.8.2	Zellsortierung am High-Speed-Cell-Sorter MoFlo® .....	44
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
3.1	Generierung von plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDZ) mit Flt3-Ligand .....	45
3.1.1	Phänotyp der Kulturzellen (FL-BM DZ) .....	46
3.1.2	Zytokinproduktion der FL-BM pDZ und cDZ .....	51
3.2.	Stimulationen der FL-BM DZ mit CpG-2216, CpG-1668 und R-848 .....	53
3.2.1	Reifung und Zytokinproduktion durch CpG-ODN Stimulation sind TLR9 abhängig .....	53
3.2.2	Effekte der Konzentration von Typ A und Typ B CpG-ODN auf die Zytokinproduktion der FL-BM Zellen .....	55
3.2.3	Unterschiedliche Expression der mRNA der Typ-I IFN Gene nach Stimulation mit CpG-1668, CpG-2216, HSV-1 und R-848 .....	56
3.2.4	Inhibition der IFN- $\alpha$ Produktion der FL-BM DZ durch CpG-1668 und R-848 .....	57
3.2.5	Unterschiedliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B .....	59
3.2.6	Versuch zur Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TPCK .....	60
3.2.7	p50 defiziente Mäuse reagieren auf hohe Konzentrationen von CpG-1668 mit der Produktion von IFN- $\alpha$ .....	61
3.3.	Welche chemische Komponente der CpG-ODN ist für die unterschiedliche IFN- $\alpha$ Induktion verantwortlich? .....	63
3.3.1	Einfluss der CpG-Kernsequenz .....	63



3.3.2	Einfluss der Phosphothioat-Bindungen des Rückgrats.....	64
3.3.3	Einfluss der Guanodin-Anhänge von CpG-2216.....	66
3.3.4	Spezies-Spezifität von CpG-2216, CpG-1668, CpG-2006 und CpG-2006polyG .....	68
3.4	TLR9 unabhängige und abhängige Erkennung von HSV-1.....	70
3.4.1	FL-BM DZ aus TLR9 und MyD88 defizienten Mäusen produzieren IFN- $\alpha$ als Immunantwort auf Stimulation mit HSV-1 .....	70
3.4.2	FL-BM cDZ und pDZ produzieren IFN- $\alpha$ auf Stimulation mit HSV-1 TLR9 unabhängig .....	72
3.4.3	<i>Ex vivo</i> isolierte Knochenmarkszellen produzieren IFN- $\alpha$ auf HSV-1 Stimulation TLR9 unabhängig .....	74
3.4.4	GM-CSF DZ produzieren IFN- $\alpha$ auf HSV-1 Stimulation TLR9 unabhängig....	78
3.4.5	Makrophagen produzieren IFN- $\alpha$ auf HSV-1 Stimulation TLR9 unabhängig..	79
3.4.6	Die Immunantwort auf hitzeinaktivierten HSV-1 ist TLR9 abhängig .....	80
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
4.1	Generierung und Charakterisierung von murinen pDZ.....	83
4.1.1	Flt3-L generierte DZ (FL-BM DZ) besitzen plasmazytoiden Phänotyp .....	83
4.1.2	R-848 und CpG-DNA bewirken eine Aktivierung der Flt3-L generierten pDZ.	84
4.2.	Guanosinkette am 3'Ende von CpG-2216 ist eine entscheidende Komponente für die IFN- $\alpha$ Induktion bei pDZ .....	87
4.3	Unterschiedliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt zu Inhibition der IFN- $\alpha$ Produktion .....	88
4.4	Herpes simplex Virus-1 induziert IFN- $\alpha$ Produktion über TLR9 abhängige und unabhängige Wege .....	90
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
	<b>Eigene Publikationen und Posterpräsentationen .....</b>	<b>112</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>113</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>114</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 Angeborene und erworbene Immunität

Immunität - der Schutz vor fremden Organismen oder Substanzen- besteht bei Wirbeltieren sowohl aus einer unspezifischen (angeborenen) und spezifischen (erworbenen) Komponente. Bei einer Infektion treten als erstes die Komponenten des angeborenen Immunsystems auf, die jedoch nicht auf ein bestimmtes Pathogen spezialisiert sind und auch keinen gezielten Schutz gegen eine erneute Infektion geben. Sie steht im Gegensatz zu der erworbenen Immunität, die sich durch eine sehr hohe Spezifität auszeichnet und zudem über ein „Gedächtnis“ verfügt, weshalb bei einer erneuten Infizierung mit demselben Pathogen die Immunreaktion schneller und effektiver erfolgt. Da es nach einer Infektion ca. fünf bis sechs Tage dauert, bis die erworbene Immunität eintritt, stellen die Komponenten der angeborenen Immunität die erste Verteidigungslinie des Körpers dar. Die meisten eingedrungenen Pathogene werden so in den ersten Tagen nach der Infektion eliminiert. Falls dies nicht gelingt, wird die adaptive Immunantwort ausgelöst. Beide Systeme funktionieren nicht komplett getrennt von einander, sondern beeinflussen sich gegenseitig und können nur im Zusammenspiel die bestmögliche Immunantwort bilden [Kuby, 2000; Lo, 1999].

Zu der angeborenen Immunität zählen neben anatomischen Barrieren (Haut, Mukosa) und physiologischen Barrieren (Körpertemperatur, Fieber, pH-Wert im Magen) auch Zelltypen, die hauptsächlich auf Phagozytose spezialisiert sind. Dazu gehören Natürliche Killer (NK)-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen (DZ). Durch die Phagozytose der Mikroorganismen werden neben der Aktivierung des Komplementsystems auch antimikrobielle Peptide, Zytokine und Chemokine sezerniert. So kann die Infektion entweder komplett aus dem Organismus entfernt werden, oder so lange unter Kontrolle gehalten werden, bis das erworbene Immunsystem die Bekämpfung übernehmen kann [Medzhitov, 2000a und b].

Die zellulären Bestandteile des erworbenen (adaptiven) Systems sind B- und T-Lymphozyten. Sowohl B-Lymphozyten als auch T-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche Antigen bindende Rezeptoren. Bei den B-Zellen stellen diese Antigenrezeptoren Immunglobuline dar, die direkt mit den Antigenen reagieren können und nach einer Aktivierung die Immunglobuline als lösliche Antikörper sezernieren. Diese spezifischen Antikörper binden an das erkannte Antigen und markieren es als Fremdkörper, der dann aus dem Körper eliminiert werden kann (= humorale Immunität). Die Rezeptoren auf den T-Zellen können Antigene in Form von Peptiden nur erkennen, wenn sie an Moleküle der MHC Klassen I oder II gebunden sind und so von einer anderen Zelle präsentiert werden. Die zwei Hauptpopulationen der T-Zellen sind die T-Helfer ( $T_H$ ) Zellen und die T-Zytotoxischen ( $T_Z$ )

Zellen. Im Allgemeinen exprimieren T<sub>H</sub>-Zellen CD4 auf ihrer Oberfläche und erkennen Antigene, die an MHC-II gebunden sind. T<sub>Z</sub> Zellen sind CD8 positiv und erkennen Antigene, wenn sie an MHC-I Moleküle gebunden sind. Sobald eine reife T<sub>H</sub>-Zelle mit einem Antigen-MHC-II-Komplex in Berührung kommt wird sie zu einer Effektorzelle und sekretiert verschiedenste Zytokine, welche wiederum direkte Effekte auf andere Immunzellen haben. Die T<sub>Z</sub>-Zelle ist darauf spezialisiert ihre Umgebung auf Zellen zu untersuchen, die auf ihrer Oberfläche Komplexe von MHC-I und Antigen tragen und solche dann zu eliminieren (= zelluläre Immunität). Von jedem dieser Zelltypen werden auch so genannte „Gedächtniszellen“ gebildet, die besonders langlebig sind und bei einer erneuten Infektion eine schnellere und effektivere Immunantwort ermöglichen.

Der Hauptunterschied zwischen angeborener und erworbener Immunität liegt in den Rezeptoren, die für die Antigenerkennung nötig sind. Im adaptiven Immunsystem werden die Rezeptoren der T- und B Lymphozyten während ihrer Entwicklung somatisch generiert und somit nicht von Generation zu Generation weitervererbt. Somit muss jeder Nachkomme sich sein eigenes Repertoire an Antigen-Rezeptoren bilden [Medzhitov, 2000b]. Hingegen sind die Gene für die Rezeptoren, die bei der Antigenerkennung in der angeborenen Immunität eine Rolle spielen, in der Keimbahn kodiert und werden weitervererbt. So ist die Anzahl der Antigene, die durch die Rezeptoren erkannt werden stark beschränkt. Die Strategie des angeborenen Immunsystems ist aber nicht jedes einzeln vorkommende Antigen zu erkennen, sondern lediglich hoch konservierte Strukturen, wie sie in Mikroorganismen, aber nicht im Wirtsorganismus vorkommen [Medzhitov, 2000b]. Diese Strukturen werden Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) und die Rezeptoren, die solche PAMPs erkennen Struktur-erkennende Rezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRRs) genannt [Janeway, 1989]. PRR werden hauptsächlich von Antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen, Monozyten, B-Zellen und Dendritischen Zellen exprimiert. PRR können entweder auf der Zelloberfläche oder intrazellulär exprimiert werden oder als sekretierte Proteine in Körperflüssigkeiten vorkommen [Medzhitov, 2000a].

Im angeborenen Immunsystem gibt es drei verschiedene Arten von PRRs:

- A) In Blut bzw. Gewebeflüssigkeiten gelöste PRR (z.B. *Mannose-Binding-Lectin*), die neben der Opsonierung von Pathogenen, auch bei der Aktivierung des Komplementsystems beteiligt sind.
- B) Membrangebundene PRR (z.B. *Scavenger-Rezeptoren*), die auf der Zelloberfläche exprimiert werden und nach der Erkennung eines Fremdorganismus zu dessen Phagozytose und Zerstörung im Lysosom führen.
- C) Signalgebende PRR (z.B. *Toll-like Rezeptoren*) die nach Bindung eines PAMPs die Expression von Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen induzieren [Medzhitov, 1997; Janeway, 2002].

Die Ausschüttung von Zytokinen und die erhöhte Expression von kostimulatorischen Molekülen führen zur Reifung von Dendritischen Zellen und der Aktivierung von T-Lymphozyten. So sind angeborene und erworbene Immunität miteinander verknüpft [Medzhitov, 2000a und b].

## 1.2 Toll-like Rezeptoren

### 1.2.1 Allgemeines

Eine Hauptgruppe der PRRs stellt die Familie der Toll-like Rezeptoren dar. Ursprünglich wurde das Rezeptormolekül Toll in *Drosophila* identifiziert und als essentiell für die dorsoventrale Polarität während der Embryogenese beschrieben [Hashimoto, 1988]. Zudem wurde gezeigt, dass Toll im Immunsystem der adulten Insekten für die Abwehr gegen Pilzinfektionen eine entscheidende Rolle spielt [Lemaitre, 1996]. Homologien zu dem *toll* Gen aus der Fruchtfliege wurden auch in Säugetieren gefunden und „toll-like receptors“ (TLR) genannt [Medzhitov, 1997]. Die Familie der TLRs besteht in Säugern mittlerweile aus elf Mitgliedern [Akira, 2004].

TLR	PAMP	PATHOGEN	REFERENZ
TLR1	bildet mit TLR2 ein Heterodimer		Takeuchi; 2002
TLR1/TLR2	OspA	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Alexopoulou; 2002
TLR2	Lipoproteine Peptidoglykane Zymosan	Bakterien gram <sup>+</sup> Bakterien Hefen	Takeda; 2003
TLR2/TLR6	MALP-2	Mykobakterien	Takeuchi; 2000
TLR3	ds RNA	Viren	Alexopoulou; 2001
TLR4	LPS  HSP60	gram <sup>-</sup> Bakterien  Wirt	Poltorak; 1998 Hoshino; 1999 Ohashi; 2000
TLR5	Flagellin	Bakterien	Hayashi; 2001
TLR6	bildet mit TLR2 ein Heterodimer		Takeuchi; 2001
TLR7	ss RNA	Viren	Heil; 2004 Diebold; 2004
TLR8	ss RNA	Viren	Heil; 2004
TLR9	CpG-DNA	Bakterien, Viren	Hemmi; 2000
TLR10	unbekannt	unbekannt	-
TLR11	unbekannt	Erreger von Harnwegsinfektionen	Zhang; 2004

Tab. 1.1: Humane und murine Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden (nach Akira, 2004)

Alle TLRs sind Typ I Transmembran-Rezeptoren, die durch eine extrazelluläre Domäne mit Leucin reichen Regionen (LRR) und einer intrazellulären Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne charakterisiert sind [Hashimoto, 1988; Rock, 1998]. Diese TIR Domäne hat starke Homologien zu der zytoplasmatischen Domäne des IL-1 Rezeptors. Innerhalb der TIR Domäne existieren drei stark konservierte Regionen, die essentiell für die weitere Signalübertragung sind [Akira, 2004]. Die extrazellulären Domänen dieser beiden Rezeptoren unterscheiden sich aber deutlich, da der IL-1 Rezeptor aus drei Immunglobulindomänen besteht, während die TLRs aus LRRs bestehen, die wohl direkt an der Erkennung von PAMPs beteiligt sind [Akira, 2004, Rutz, 2004; Beutler, 2003, Bauer, 2001].

Für fast alle TLRs wurden in der Zwischenzeit die natürlichen Liganden beschrieben (Tab. 1.1). Die meisten TLRs werden an der Zelloberfläche exprimiert; TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind jedoch in intrazellulären Kompartimenten zu finden [Ahmad-Nejad, 2002; Heil, 2003; Matsumoto, 2003]. Die Interaktion von PAMPs mit TLRs führt zur Rekrutierung verschiedenster Adaptormoleküle im Zellinneren und bewirkt so u. a. die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-12 sowie von Typ I Interferonen. Je nachdem welcher TLR aktiviert wird, können die exprimierten Zytokine variieren. Die unterschiedlichen Aktivierungskaskaden von NF- $\kappa$ B werden unter 1.2.2 und 1.2.3 näher beschrieben.

## 1.2.2 MyD88-abhängiger Signalweg

Fast alle Toll-like Rezeptoren benötigen für eine Signalweiterleitung in die Zelle, nach der Aktivierung durch einen Liganden, das Adaptorprotein MyD88 (*Myeloid-Differentiation-Primary-Response-Gene 88*). MyD88 besitzt C-terminal eine TIR-Domäne und N-terminal eine so genannte *death domain*. Mit seiner TIR-Domäne assoziiert das Adaptorprotein mit der intrazellulären TIR-Domäne des aktivierten TLRs, mit der *death domain* wird IRAK (*IL-1-Rezeptor-assoziierte-Kinase*) an den Rezeptor rekrutiert und aktiviert. IRAK dissoziiert von dem Rezeptor-MyD88-Komplex ab und phosphoryliert TRAF6 (*Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiertes-Faktor 6*), welches wiederum den IKK-Komplex (*I $\kappa$ B Kinase-Komplex*) aktiviert. Über den IKK-Komplex wird I $\kappa$ B phosphoryliert, das als Inhibitor mit dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B assoziiert ist. Durch die Phosphorylierung dissoziiert I $\kappa$ B von NF- $\kappa$ B ab und NF- $\kappa$ B kann in den Nukleus wandern und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen bewirken [Takeda, 2005]. Dieser Signalweg wird von TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 und TLR9 benutzt. Eine schematische Darstellung ist in Abb. 1.1 abgebildet.

Ein zweites Adaptorprotein mit einer TIR-Domäne wurde erst vor kurzer Zeit parallel von zwei Arbeitsgruppen beschrieben und TIRAP (*TIR-domain-containing-adaptor protein*) bzw.

Mal (*MyD88-adaptor-like protein*) genannt [Horng, 2001; Fitzgerald, 2001]. Dieses Protein enthält im Gegensatz zu MyD88 keine *death domain* ist aber ein notwendiger Co-Faktor von MyD88, und bei der Induktion von NF- $\kappa$ B nach der Stimulation von TLR2 und TLR4 essentiell [Horng, 2002; Yamamoto, 2002] (Abb.:1.1).

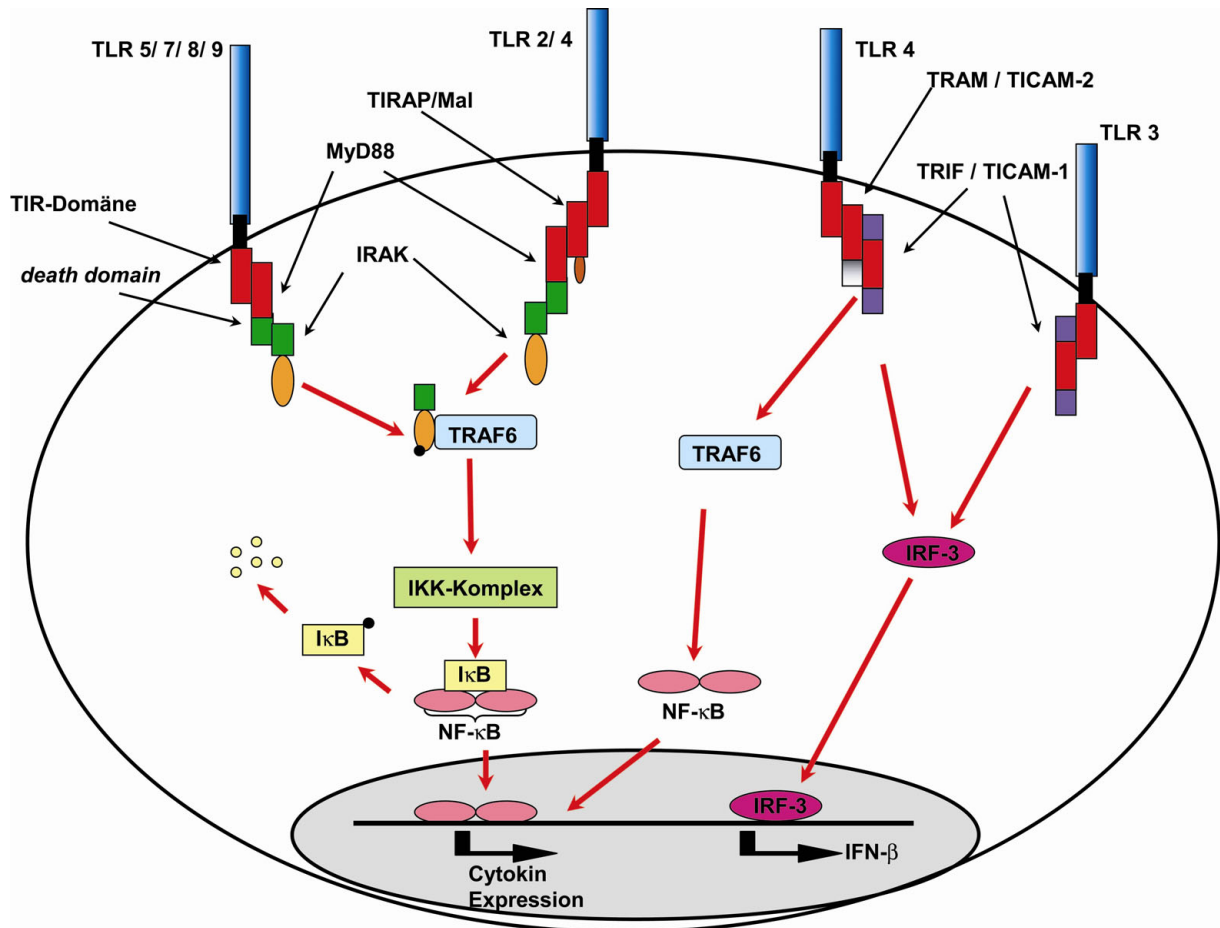


Abb.1.1: Vereinfachte Darstellung der MyD88-abhängigen und unabhängigen Signalwege von Toll-like Rezeptoren. (Nach Takeda, 2005)

### 1.2.3 MyD88-unabhängiger Signalweg

In MyD88 defizienten Makrophagen wurde nach der Stimulation mit den TLR-Liganden ds-RNA (TLR3) und LPS (TLR4) die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, aber keine Produktion von inflammatorischen Zytokinen nachgewiesen [Kawai, 1999]. Dies deutete daraufhin, dass es neben dem MyD88 abhängigen Signalweg, eine MyD88 unabhängige Komponente geben muss, die bei der Signaltransduktion von TLR3 und TLR4 beteiligt ist. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Stimulation von TLR3 und TLR4 zur Aktivierung des

Transkriptionsfaktors IRF-3 (*Interferon-regulatory-factor-3*) und der Expression von IFN- $\beta$  führt [Kawai, 2001; Doyle, 2002].

Für diesen MyD88-unabhängigen Signalweg wurde das Adaptormolekül TRIF (*TIR-domain-containing-adaptor-inducing-IFN- $\beta$* ) bzw. TICAM-1 (*TIR-containing-adaptor-molecule-1*) identifiziert [Yamamoto, 2002; Oshiumi, 2003], das wie MyD88 und TIRAP eine TIR-Domäne besitzt. Die Mechanismen, wie der TRIF/TICAM-1-Signalweg zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IRF-3 führt, sind Gegenstand aktueller Forschung vieler Arbeitsgruppen.

Ein viertes Molekül mit einer TIR-Domäne wurde erst vor kurzem identifiziert. TRAM (*Trif-related-adaptor-molecule*) bzw. TICAM-2 scheint in der TLR4 vermittelten, MyD88-unabhängigen, Aktivierung von IRF-3 und Induzierung von IFN- $\beta$  essentiell zu sein [Fitzgerald, 2003; Yamamoto, 2003].

Eine schematische Zusammenfassung der Signalwege ist in Abb. 1.1 dargestellt.

## 1.3 Dendritische Zellen

### 1.3.1 Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität

Dendritische Zellen (DZ) wurden erstmals von Ralf Steinman im Jahr 1973 beschrieben [Steinman, 1973]. Sie sind eine sehr heterogene Gruppe professioneller Antigen-präsentierender Zellen (APZ), die eine zentrale Rolle im Immunsystem spielen.

DZ entwickeln sich aus CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark. Unreife DZ findet man hauptsächlich in der Peripherie um mögliche Pathogene oder Infektionen aufzuspüren. Diese Zellen weisen eine starke Expression von Endozytose-Rezeptoren auf und besitzen eine hohe Phagozytoseaktivität. Zudem enthalten sie intrazellulär viele MHC-II Moleküle und exprimieren kaum kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche. Sie sind somit perfekt ausgerüstet für die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen. Typische Antigene, die von DZ über *Pattern Recognition Receptors* aufgenommen werden, sind mikrobielle oder virale Bestandteile wie z.B. LPS, CpG-DNA oder ds-RNA [Mellman, 2001]. Aber auch inflammatorische Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 wirken als Gefahren - bzw. Reifesignale. Nach der Antigenaufnahme wandern die DZ unter Reifung zu den T-Zell-Bereichen lymphatischer Gewebe (Milz und Lymphknoten) [Banchereau, 1998; Janeway, 1997].

Reife dendritische Zellen besitzen eine typische verzweigte Morphologie (dendritische Ausläufer), exprimieren viel MHC-II Moleküle und sind auch nicht mehr fähig Endozytose zu betreiben. Im Gegensatz dazu tragen diese Zellen nun kostimulatorische Moleküle (z.B. CD40; CD86) auf ihrer Oberfläche, die für den direkten Zellkontakt mit T-Zellen und deren Aktivierung unerlässlich sind.



Im T-Zell-Bereich des lymphatischen Gewebes präsentieren die DZ das aufgenommene Antigen, prozessiert zu Peptiden, gebunden an MHC-II Molekülen auf ihrer Zelloberfläche, naiven T-Zellen, die so aktiviert werden und die Immunantwort auf weitere Zellen des Immunsystems (B-Zellen, Makrophagen) weiterleiten [Banchereau, 1998]. Bei dieser T-Zell-Aktivierung ist von entscheidender Rolle, mit welchem DZ-Subtyp die T-Zelle in Berührung kommt. Man unterscheidet zwischen DZ1 und DZ2. Die Unterscheidung in DZ1 und DZ2 erfolgt auf Grund ihrer Fähigkeit unterschiedliche Immunantworten der  $T_H$ -Zellen zu induzieren. DZ1 produzieren nach ihrer Aktivierung große Mengen an IL-12 und induzieren somit eine starke  $T_H1$ -Zell-Antwort, während DZ2 kaum IL-12 produzieren und eine  $T_H2$ -Zell-Antwort induzieren [Liu, 2001]. Bei den  $T_H1$  und  $T_H2$  Zellen handelt es sich um  $T_H$ -Zellen, die unterschiedliche Zytokine produzieren.  $T_H1$ -Zellen bilden hauptsächlich IFN- $\gamma$  und IL-2 und führen zu einer zellvermittelten Immunität. Die  $T_H2$ -Zellen produzieren überwiegend IL-4, IL-5 und IL-10, was zu einer vorwiegend humoralen Immunantwort führt [Janeway, 1997]. Durch diese Kontrolle einer spezifischen T-Zell-Immunität stellen die DZ ein entscheidendes Bindeglied zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem dar [Steinman, 1991; Banchereau, 2000]. DZ1 werden auch „myeloide DZ“ genannt, da sie typische Oberflächenmoleküle tragen (v. a. CD11b und CD11c), die zu der myeloiden Linie gezählt werden, wo hingegen DZ2 diese Marker nicht tragen und so zu der „lymphoiden“ Linie gerechnet werden. Die wichtigsten Oberflächenmoleküle zur Charakterisierung von Dendritischen Zellen, ihre Funktion und ihre Expression auf verschiedenen Zelltypen sind in Tab. 1.2 dargestellt.

In der Maus basiert die Unterscheidung der DZ-Subpopulationen hauptsächlich auf der Expression von CD8, da im Gegensatz zu den humanen DZ sowohl die myeloiden als auch die lymphoiden DZ CD11c exprimieren. So werden ( $CD8\alpha^{pos}$ ,  $CD11b^{neg}$ ,  $CD11c^{pos}$ ) DZ lymphoiden Vorläufern zugesprochen, während ( $CD8\alpha^{neg}$ ,  $CD11b^{pos}$ ,  $CD11c^{pos}$ ) DZ „myeloid“ genannt werden [Shortman, 2002]. Obwohl diese strikte Einteilung mittlerweile überholt ist, da ein gemeinsamer Vorläufer der Zellen postuliert wurde [del Hoyo, 2002], ist die Einteilung der einzelnen Populationen anhand ihrer Oberflächenmoleküle die einzige Möglichkeit zur Klassifizierung. Neben diesen beiden klassischen DZ-Populationen wurden als weitere Untereinheit der DZ die plasmazytoiden DZ (pDZ) identifiziert, die sowohl aus lymphoiden Vorläuferzellen, als auch aus myeloiden Vorläuferzellen entstehen können und somit nicht zweifelsfrei einer dieser beiden Gruppen zugeteilt werden können [Karsunky, 2005].

CD	Funktion	Exprimiert auf
<b>CD4</b>	MHC-II Co-Rezeptor bindet IL-16 und HIV gp 120	T-Zellen (Subtypen) Makrophagen/Monozyten
<b>CD8<math>\alpha</math></b>	MHC-I Co-Rezeptor	T-Zellen (Subtypen) Dendritische Zellen (Subtypen)
<b>CD11b</b>	Untereinheit des Integrins CR3 bindet CD54	T-Zellen (Subtypen) B-Zellen (Subtypen) Makrophagen /Monozyten myeloide Dendritische Zellen NK-Zellen
<b>CD11c</b>	Untereinheit des Integrins CR4 bindet Fibrinogen	T-Zellen (Subtypen) B-Zellen (Subtypen) Dendritische Zellen NK-Zellen
<b>CD25</b>	$\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors	aktivierte T und B-Zellen Makrophagen/Monozyten
<b>CD31</b>	Adhäsionsmolekül vermittelt sowohl Leukozyten/Endothel- als auch Endothel/Endothel- Wechselwirkung	T-Zellen B-Zellen NK-Zellen Monozyten Erythrozyten
<b>CD36</b>	Adhäsionsmolekül der Blutplättchen beteiligt an der Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen	Dendritische Zellen Stammzellen/Vorläuferzellen Makrophagen/Monozyten Erythrozyten
<b>CD40</b>	Bindet CD40L Rezeptor für kostimulatorische Signale für B-Zellen fördert Wachstum, Differenzierung und Isotypwechsel von B-Zellen fördert Zytokinproduktion bei Makrophagen und Dendritischen Zellen	B-Zellen Dendritische Zellen Makrophagen/Monozyten Fibroblasten
<b>CD45RA</b>	erhöht Signalvermittlung über den Antigenrezeptor von B-und T-Zellen	B-Zellen T-Zellen plasmazytoide Dendritische Zellen
<b>CD62L</b>	Leukozyten-Adhäsionsmolekül bindet CD34 vermittelt das „Entlangrollen“ am Endothel	B-Zellen T-Zellen plasmazytoide Dendritische Zellen
<b>CD69</b>	früher Aktivierungsmarker	aktivierte B-und T-Zellen aktivierte Dendritische Zellen
<b>CD80</b>	T-Zell Kostimulation Ligand für CD28	aktivierte B-und T-Zellen aktivierte Dendritische Zellen
<b>CD86</b>	T-Zell Kostimulation	aktivierte B-und T-Zellen aktivierte Dendritische Zellen
<b>CD123</b>	$\alpha$ -Kette des IL-3 Rezeptors	Knochenmarksstammzellen (human) Dendritische Zellen Makrophagen/Monozyten

Tab. 1.2: Wichtige Zell-Oberflächenmoleküle, ihre Funktion und Expression (nach Janeway, 1997)

### 1.3.2 Humane und murine plasmazytoide Dendritische Zellen (pDZ)

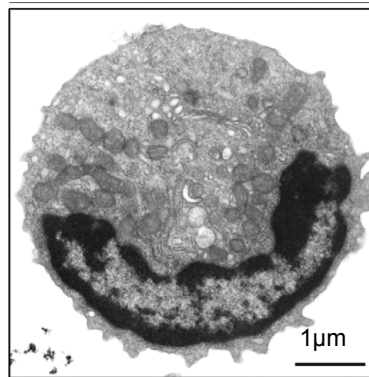
Jahrzehnte lang war Virologen eine kleine Zellpopulation, die sogenannten NIPC = Natürliche Interferon produzierenden Zellen (*natural interferon producing cells*), im menschlichen Blut bekannt, die auf virale Stimulation hin fähig war, große Mengen an Typ I Interferone zu produzieren. Daneben waren Zellen bekannt, die eine plasmazellartige Morphologie aufwiesen, gehäuft in der T-Zellzone von Lymphknoten auftraten und myeloide Oberflächemarker trugen wie CD4, CD31, CD36 und CD68. Diese Zellen trugen den Namen plasmazytoide T-Zellen oder plasmazytoide Monozyten [Galibert, 2001]. Nachdem gezeigt werden konnte, dass diese plasmazytoiden T-Zellen/Monozyten nach der Stimulation mit IL-3 und CD40L zu Dendritischen Zellen reifen, wurden sie in plasmazytoide DZ umbenannt [Grouard, 1997]. Erst 1999 wurde von zwei Gruppen unabhängig von einander gezeigt, dass es sich bei den Interferon produzierenden Zellen und den plasmazytoiden DZ um denselben Zelltyp handelt [Cella, 1999; Siegal, 1999].

Die charakteristischen Merkmale dieser Zellen sind:

- Fähigkeit große Mengen an Typ I Interferonen zu produzieren (bis zu 10 pg/Zelle)
- Plasmazytoide Morphologie (rund, glatte Oberfläche, exzentrischer Nukleus)
- Vorkommen in Milz, Knochenmark, Lymphknoten, Thymus, Blut und auch Leber
- Sehr geringe Anzahl (0,2-1,5 % der Zellen) im Organismus
- Entwickeln dendritische Morphologie (Ausläufer) nach Aktivierung

Plasmazytoide DZ konnten über mehrere Jahre hinweg nur aus humanen Proben isoliert werden. Charakteristisch für humane pDZ ist die Expression von CD4<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> und CD123<sup>+</sup>. Zusätzlich exprimieren pDZ aus dem Blut und Knochenmark BDCA-2<sup>+</sup> und BDCA-4<sup>+</sup>. CD11c ist dagegen nicht auf der Zelloberfläche nachzuweisen [Colonna, 2004].

Erst 2001 konnten pDZs auch aus der Maus isoliert werden [Asselin-Paturel, 2001; Bjorck, 2001; Nakano, 2001]. Sie besitzen viele morphologische, phänotypische und funktionelle Gemeinsamkeiten mit den humanen pDZ, unterscheiden sich aber in der Expression von ein paar charakteristischen Oberflächenmarkern. Wesentliche Unterschiede liegen bei der Expression von CD45R (B220), CD123 und CD11c. Im Gegensatz zu den humanen pDZ wird auf der Zelloberfläche der murinen pDZ der klassische B-Zellmarker CD45R (B220) stark exprimiert, was erklärt, weshalb die pDZ der Maus erst Jahre nach den humanen pDZ identifiziert werden konnten, da dieser Marker oft benutzt wurde, um B-Zellen aus der aufzureinigenden Zellsuspension zu entfernen. Ebenfalls im Gegensatz zu humanen pDZ ist bei den pDZ aus der Maus auch der allgemeine Marker für DZ, CD11c, auf der Zelloberfläche detektierbar. Hingegen wird der „klassische“ Marker für humane pDZ, CD123, nicht exprimiert [Colonna, 2004].



**Abb. 1.2: Plasmazytoide Dendritische Zelle aus murinem Blut.** Elektronenmikroskopische Aufnahme (zur Verfügung gestellt von Meredith O’Keeffe, WEHI, Melbourne Australien),

Plasmazytoide DZ können direkt auf virale oder bakterielle Stimulation reagieren, da sowohl humane, als auch murine pDZ überwiegend TLR7 und TLR9 exprimieren [Hornung, 2002]. Nach der Aktivierung durch CpG-DNA bzw. einzelsträngige RNA reagieren die pDZ mit der Produktion von Typ I Interferonen und der Expression von kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Zelloberfläche. Neben Interferonen werden auch eine Reihe weiterer Zytokine, z.B. TNF- $\alpha$ , IL-6, IP-10, IL-8 und IL-12 [Hochrein, 2002; Krug, 2001b] produziert. Dadurch verbinden sie die angeborene Immunität mit der erworbenen. Nach der direkten Reaktion auf die Stimulierung verlieren die pDZ ihre Fähigkeit Interferone zu produzieren, und entwickeln eine dendritische Morphologie, die durch die charakteristischen Ausläufer (Dendriten) gekennzeichnet ist. Durch freigesetztes IFN- $\alpha/\beta$  und IL-12 werden Natürliche Killer-Zellen aktiviert und zur Sekretion von IFN- $\gamma$  angeregt. Zudem induzieren Typ I Interferone die Differenzierung und Reifung von DZ aus Monozyten und regulieren die IL-12 Produktion anderer DZ. Des Weiteren führen IFN- $\alpha/\beta$  zusammen mit dem ebenfalls produzierten IL-6 zur Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und der Sekretierung von Immunglobulinen. T-Zellen werden durch die Produktion von IL-12 in Richtung T<sub>H</sub>1 polarisiert. Zudem produzieren pDZ eine Vielzahl an Chemokinen, die wiederum aktivierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen anziehen [Colonna, 2004].

Obwohl die pDZ zu den Dendritischen Zellen zählen, ist die Frage, ob die pDZ als professionelle antigenpräsentierende Zelle (APZ) bezeichnet werden können noch umstritten, da bei frisch isolierten pDZ die Fähigkeit Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren nur sehr schwach ausgeprägt ist [Colonna, 2004]. Im Gegensatz dazu erhöhen aktivierte pDZ die Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen und sind in der Lage Antigene zu präsentieren und antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen und T<sub>H</sub>1-CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Proliferation anzuregen [Olweus, 1997; Asselin-Paturel, 2001; Krug,

2003]. Verglichen mit den antigen-präsentierenden Fähigkeiten der klassischen, myeloiden DZ sind diese Fähigkeiten der pDZ aber als eher gering einzustufen.

### 1.4. Interferone

Interferone wurden 1957 von Isaacs & Lindemann als Faktoren beschrieben, die sehr schnell von virusinfizierten Zellen gebildet werden, um benachbarte Zellen vor der Infektion zu schützen. Es gibt zwei Interferon-Klassen: Typ I und Typ II Interferone.

Zu den Typ I Interferonen zählen die Zytokine: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\delta$  und IFN- $\tau$  [Pestka, 2004], wobei die bedeutendsten IFN- $\alpha$  und  $\beta$  sind. Von IFN- $\alpha$  gibt es mindestens 12 Subtypen, wohingegen IFN- $\beta$  das Produkt eines einzigen Gens ist. Typ I Interferone können in geringer Menge von Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten gebildet werden, als Hauptproduzenten werden jedoch plasmazytoide DZ betrachtet. Der bekannteste Auslöser für die Interferonsynthese sind virale Infektionen [Janeway, 1997] aber auch Bakterien können die Produktion von Typ I Interferonen auslösen [Yamamoto, 1992].

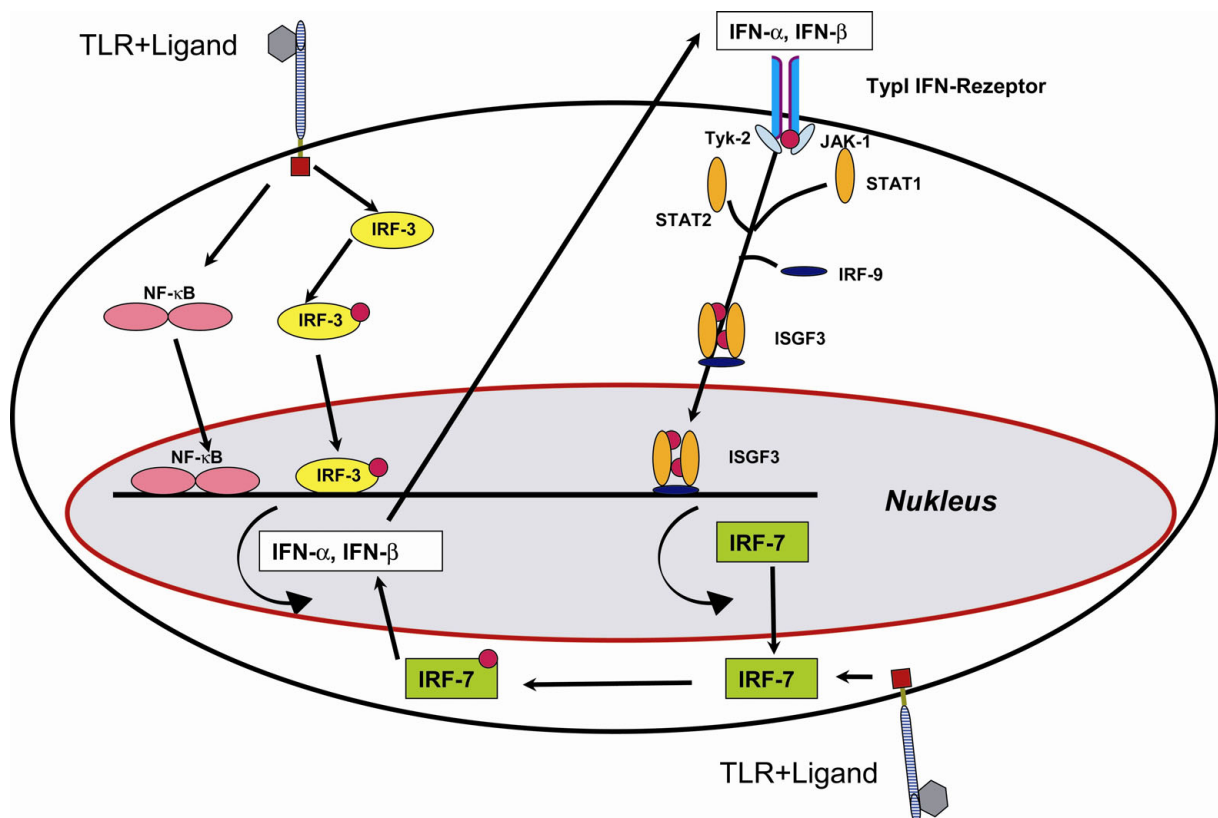


Abb. 1.3: Vereinfachtes Schema der Typ I Interferon-Produktion (nach Marie, 1998; Sato, 1998, Barchet, 2002).

In dem gegenwärtigen Modell der Typ I Interferon Produktion, spielen IRF-3 und IRF-7 (*interferon regulatory factor*) eine zentrale Rolle [Biron, 2001]. Durch einen externen Stimulus

wird konstitutiv gebildetes IRF-3 im Zytoplasma phosphoryliert und so aktiviert in den Nukleus transloziert, wo es die Expression von Typ I Interferonen induziert [Sato, 1998]. Die so gebildeten geringen Mengen an IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  werden sekretiert und binden sowohl autokrin als auch parakrin an den Typ I IFN Rezeptor. Durch diese Bindung wird der Jak/Stat abhängige Transduktionsweg aktiviert, was zur Bildung des ISGF3-Komplexes führt. Dieser Komplex wiederum induziert im Nukleus die Bildung von IRF-7, welches bei Aktivierung selbst in den Nukleus transloziert wird und dort die Transkription später IFN Gene induziert (Abb. 1.4). Auf diese Weise wird ein positiver *feedback-loop* induziert, womit eine große Menge an IFN $\alpha/\beta$  produziert werden kann [Marie, 1998; Taniguchi, 2001]. Neue Studien zeigen, dass in pDZ bereits IRF-7 konstitutiv exprimiert ist und somit nach der Aktivierung bereits große Mengen an Typ I Interferonen direkt ausgeschüttet werden können, ohne den positiven *feedback-loop* und der Beteiligung des Typ I IFN Rezeptors (Abb. 1.3) [Barchet, 2002; Takauji, 2002; Kerkmann, 2003].

Als molekulare Strukturen, die zur IFN- $\alpha$  und  $\beta$  Produktion führen, sind *in vivo* bisher CpG-DNA (TLR9-Ligand), dsRNA (TLR3-Ligand) und ssRNA (TLR7-Ligand) identifiziert [Krug, 2001; Kadowaki, 2001; Ito, 2002]. Durch die Bindung von sezernierten Typ I Interferonen an den IFN- $\alpha/\beta$ - Rezeptor auf der Zelloberfläche werden nicht infizierte Zellen resistent gegen das Virus, in dem sie Enzyme exprimieren, die die virale Replikation hemmen [Katze, 2002]. Dazu zählen die ds RNA-aktivierte Serin-Threonin-Proteinkinase (PKR), die 2'-5'-Oligoadenylatzyklase (OAS) und RNase L.

Zusätzlich zu den antiviralen Funktionen, vermitteln Typ I Interferone auch eine Reihe immunregulierender Effekte, wie z.B.

- Inhibition der IL-12 Expression myeloider DZ [Cousens, 1997; McRae, 1998]
- Erhöhung der Zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen [Zhang, 1998; Kadowaki, 2002]
- Induktion der Antikörperproduktion in B-Zellen [Le bon, 2001; Kadowaki, 2002]
- Verbesserung des Überlebens von T-Zellen [Marrack, 1999; Kadowaki, 2002]
- Ausreifung myeloider DZ [Ito, 2001]

Aufgrund dieser Einwirkungen auf viele verschiedene Bestandteile des Immunsystems werden Typ I Interferone oft als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität bezeichnet.

Typ II Interferon besteht nur aus IFN- $\gamma$ . Typ I Interferone unterscheiden sich stark von IFN- $\gamma$ , das von aktivierten NK-Zellen und T-Effektorzellen produziert wird und daher hauptsächlich nach der Induktion der adaptiven Immunantwort auftritt [Janeway, 1997].

## 1.5 CpG-ODN

Bereits 1893 wurde von W. Coley die Beobachtung gemacht, dass sich bei einigen Krebspatienten die Tumore verkleinerten, wenn ihnen bakterielle Zell-Extrakte aus *Streptococcus pyogenes* allein, oder zusammen mit *Serratia marcescens*, in der Nähe des Tumors injiziert wurden [Coley, 1893]. Jedoch dauerte es fast 100 Jahre, bis durch Tokunaga *et al* 1984 nachgewiesen werden konnte, dass die antitumorale und immunstimulatorische Aktivität bakterieller Zell-Lysate durch die bakterielle DNA verursacht wird [Tokunaga, 1984]. 1992 konnte durch die Arbeitsgruppe um Yamamoto gezeigt werden, dass diese immunstimulatorische Aktivität sich nur auf DNA von Prokaryonten beschränkt und nicht durch DNA von Wirbeltieren ausgelöst wird [Yamamoto, 1992].

Zwei grundlegende Unterschiede zwischen eukaryontischer und prokaryontischer DNA sind die Häufigkeit des Dinukleotids Cytosin-Guanin (CpG) im Genom des Organismus und dessen Methylierungsgrad am Cytosin. Das C-G Motif kommt bei den meisten Prokaryonten mit der erwarteten statistischen Wahrscheinlichkeit von 1:16 vor und trägt keine Methyl (CH<sub>3</sub>)- Gruppe am Cytosin. Das Genom von Wirbeltieren zeigt eine deutliche Suppression der Expression des Cytosin-Guanosin Dinukleotids (nur ca. 1:60) und ist zudem am beteiligten Cytosin zu 60-90% methyliert [Bird, 1986].

Synthetisch hergestellte, einzelsträngige DNA-Oligonukleotide (ca. 20 Basen lang) ohne Methylierungen, bei denen die C-G-Sequenz in einer genau festgelegten Basenfolge auftritt (sog. CpG-Motif) stellten sich als ebenso immunstimulatorisch heraus wie isolierte, bakterielle DNA [Krieg, 1995]. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide mit immunologisch wirksamen C-G-Motif, werden als CpG-ODN bezeichnet.

Ursprünglich wurde für die immunstimulatorische Wirkung eines CpG-ODNs ein zentrales Palindrom, das am 5'-Ende von zwei Purinen und am 3'-Ende von zwei Pyrimidinen begrenzt wird und zentral ein CpG-Dinukleotid enthält, beschrieben [Krieg, 1995; Yamamoto, 1992]. Mittlerweile sind zwei unterschiedliche Typen von CpG-ODN charakterisiert, die sich sowohl in ihrer Sequenz, als auch von ihrer Wirkung auf das Immunsystem grundlegend unterscheiden. Typ A CpG-ODN enthalten ein zentrales Palindrom mit mehreren CpG-Sequenzen und sind sowohl am 5' als auch am 3' Ende von einer Kette aus Guanosinnukleotiden (poly-G) flankiert. Das Rückgrat dieses CpG-ODN Typs ist gemischt. Das bedeutet, dass die zentrale Sequenz ein Rückgrat aus Phosphodiestern besitzt, während die poly-G Anhänge an den Enden durch Phosphothioat-Bindungen stabilisiert werden. Immunologisch bewirken Typ A CpG-ODN nur geringe Effekte auf B-Zellen, induzieren jedoch bei humanen pDZ die Produktion großer Mengen an IFN- $\alpha$  [Krug, 2001]. Der CpG-ODN Typ B enthält ursprünglich nur ein CpG-Motif in der Kernsequenz, welche zudem nicht palindromisch aufgebaut ist. An den Enden sind des Weiteren keine poly-G

Anhänge und das gesamte Oligonukleotid enthält im Rückgrat Phosphothioat Bindungen. Im Gegensatz zu Typ A CpG-ODN sind Typ B CpG-ODN nicht in der Lage die Produktion von großen Mengen IFN- $\alpha$  zu induzieren, regen aber B-Zellen effektiv zur Proliferation und Produktion von Zytokinen an. In Tabelle 1.2 sind die unterschiedlichen Wirkungen von CpG-ODN Typ A und B auf humane PBMC zusammengefasst.

	Typ A ODN	Typ B ODN	
Proliferation	+/-	+++	B-Zellen
IgM	-	+++	B-Zellen
IL-10	+	++	B-Zellen
IL-6	++	+++	Monozyten
IP-10	++	++	Monozyten
IFN- $\alpha$	+++	-	pDZ
IFN- $\beta$	++	-	pDZ
IFN- $\gamma$	+++	+	NK-Zellen
CD69	+++	+	NK-Zellen

**Tab. 1.3: Unterschiedliche Wirkung beider Klassen der CpG-ODN auf humane PBMC.** (nach Verthelyi and Klinman, 2003)

CpG-DNA wurde als Ligand von TLR9 identifiziert, da TLR9 defiziente Mäuse immunologisch komplett stumm auf CpG-DNA reagierten [Hemmi, 2000; Bauer, 2001]. Nach der Aufnahme des Oligonukleotids in die Zelle erfolgt die direkte Bindung an TLR9 im Endo- bzw. Lysosom [Rutz, 2004] und der MyD88-abhängige Signalweg in der Zelle wird aktiviert (s. 1.2.2).



## 1.6 Herpes simplex Virus-1

Neben Bakterien können auch Viren wie z.B. das *Herpes simplex Virus-1* (HSV-1) die Produktion von Typ I Interferonen induzieren. Es gehört zu der großen Familie der *Herpesviridae*, die wiederum in drei Unterfamilien eingeteilt werden:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - Herpesviren. HSV-1 zählt zu den  $\alpha$ -Herpesviren, die durch ein breites Wirtsspektrum, einer kurzen Replikationszeit *in vitro* und ihrer Persistenz in Nervenzellen der Ganglien charakterisiert sind. Das infektiöse Viruspartikel (Virion) ist ca. 180-220 nm groß und besteht aus einer äußeren Membranhülle (*envelope*), dem Tegument und einem ikosaedrischen Kapsid, in dem sich das Genom, eine lineare doppelsträngige DNA von 152 kb Größe, befindet (Abb. 1.4). Das Genom kodiert ca. 75 Proteine, von denen 30% essentiell für die Virusvermehrung sind. HSV-1 infiziert hauptsächlich Epithelzellen im oralen and facialen Bereich und verursacht bläschenartige Ausschläge. Eine Infektion erfolgt durch die Fusion der viralen Hüllmembran mit der Zellmembran der Wirtszelle, wodurch das Kapsid inklusive Tegumentproteine ins Zytoplasma gelangt. Von dort wird es entlang von Mikrotubuli zum Zellkern transportiert, wo das Kapsid die virale DNA durch Kernporen in das Nukleoplasma entlässt. Im Kern findet dann im Anschluss sowohl die Replikation der viralen DNA als auch die Morphogenese des Viruspartikels statt. Die neu entstandenen Viruspartikel erhalten ihre Hülle durch Knospen an der Kernmembran der Wirtszelle (*budding*), die mit viralen Glykoproteinen besetzt ist und werden durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt. Neben dem lytischen Replikationszyklus persistieren die Viren zudem gewöhnlich lebenslang latent als episomale zirkuläre DNA im infizierten Wirt und können reaktiviert werden [Modrow, 1998].

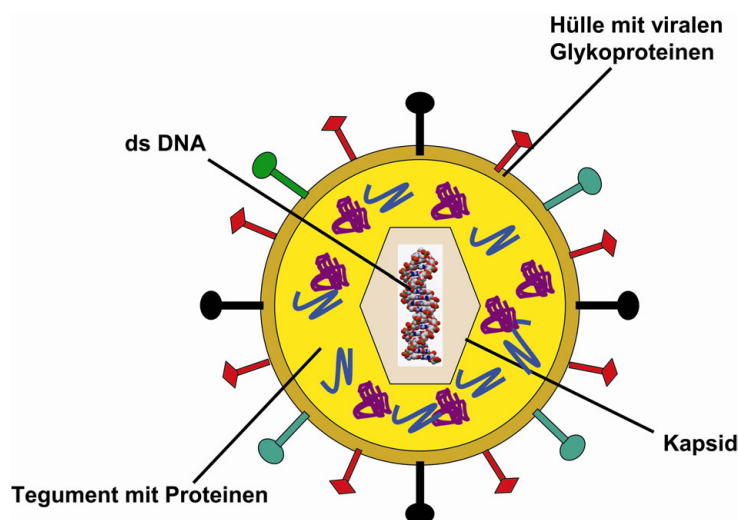


Abb. 1.4: Vereinfachte Darstellung eines HSV-1 Partikels (nach Modrow, 1998).

Die Primärinfektion erfolgt vor allem im Säuglings -und Kindesalter durch Tröpfchen –oder Schmierinfektion über die Mundschleimhaut, wodurch die Durchseuchungsrate bei 60-90% liegt [Modrow, 1998].

Bei einer Infektion mit HSV treten als erste Verteidigungslinie die Zellen des angeborenen Immunsystems auf und versuchen durch die Produktion von Interferonen eine Ausbreitung des Virus zu verhindern [Karupiah, 1993; Levy, 2001]. Zudem erfolgt die Freisetzung von IL-12, welches, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu einer Differenzierung zu T<sub>H</sub>1- Zellen anregt. CD4<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>1 Zellen locken durch Freisetzung von IFN- $\gamma$  Makrophagen zum Infektionsherd. Diese wiederum bekämpfen die Virusinfektion durch die Bildung weiterer antiviraler Substanzen, wie z.B. TNF- $\alpha$  oder Stickstoffmonoxid (NO) [Kodukula, 1999].

Eine Impfung als Schutz vor einer Herpes Infektion existiert nicht. Bei der Therapie einer akuten Infektion kommt meist *Aciclovir* zum Einsatz, das von viralen Enzymen (Thymidinkinase und DNA-Polymerase) als Substrat erkannt wird und durch den Einbau in das virale Genom bei der viralen DNA-Replikation zum Strangabbruch führt [Modrow, 1998].

## 1.6 Ziele der Arbeit

Da die plasmazytoiden Dendritischen Zellen eine extrem kleine Zellpopulation im Säugetierorganismus darstellen und es mit nur mit aufwendigen Isolierungsansätzen möglich war eine ausreichende Anzahl plasmazytoider Dendritischer Zellen aus murinen Material zu isolieren, war ein Ziel dieser Arbeit ein Kultursystem zu generieren, mit dem es möglich sein sollte diesen seltenen Zelltyp in großer Zahl aus Vorläuferzellen des Knochenmarkes zu generieren. Diese *in vitro* generierten pDZ sollten im Bezug auf ihre Expression von Oberflächenproteinen und ihrer Fähigkeit IFN- $\alpha$  und andere Zytokine auf Stimulation mit TLR-Liganden zu produzieren näher charakterisiert werden und mit *ex vivo* isolierten pDZ vergleichbar sein. Da humane pDZ hauptsächlich die Toll-like Rezeptoren 7 und 9 exprimieren war ein weiterer Schwerpunkt die Responsivität der generierten pDZ auf die synthetischen Liganden der beiden TLRs, CpG-DNA (TLR9-Ligand) und R-848 (TLR7-Ligand), näher zu analysieren. Des Weiteren sollte aufgeklärt werden, ob die natürlich induzierte IFN- $\alpha$  Produktion durch virale Stimulation mit HSV-1 auf eine TLR9 Komponente des Virus zurückzuführen ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräte

Gerät	Firma, Firmensitz
Autoklav	Variklav, H+B Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
ELISA-Washer	Skatron, Norwegen
Microplate-Reader	MWG-Biotech, Ebersberg
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Inkubatoren	Heraeus Instruments, Hanau
Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Photometer	Pharmacia, Freiburg
Pipetten	Biohit, Köln; Gilson, Camberg
Sterilbank	Lamin Air HB 2472, HERA safe, Heraeus Instruments, Hanau
Tischzentrifuge	Fuge-Vortex 2400, BIOSAN Laboratories, Inc., Warren, USA
UV-Leuchttisch	Hitachi, Düsseldorf
Videodokumentation	Video copy processor, Mitsubishi, Ratingen; Bildschirm, Hitachi, Düsseldorf; Belichtungsmesser, CS1 Cybertech, Berlin
Zentrifugen	Omnifuge 2.ORS, Megafuge3.OR, Biofuge fresco, Biofuge pico, Biofuge13, Heraeus, Hanau; Beckman J2-HC, Beckman, München
Durchflußzytometrie	FACSCallibur, FACSTFlow Supply System, Becton Dickinson, Heidelberg
Zellsorter	

Tab. 2.1: Verzeichnis der verwendeten Geräte

## 2.2 Reagenzien und Medien

### 2.2.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Firma	Firmensitz
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma-Aldrich	Frankfurt am Main
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Frankfurt am Main
Flt3-Ligand	freundl. Gabe von M. O'Keeffe, WEHI	Melbourne, Australien
G418 (Neomycin)	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich	Frankfurt am Main
m GM-CSF	PeptoTech	London, England
m IL-3	PeptoTech	London, England
m IL-4	PeptoTech	London, England
m M-CSF	PeptoTech	London, England
Pam3CysK <sub>4</sub>	EMC microcollections GmbH	Tübingen
poly (I:C)	Sigma-Aldrich	Frankfurt am Main
Propidium Jodid (PI)	Sigma-Aldrich	Frankfurt am Main
Resiquimod (R-848)	GLSythesis	Worcester, MA, USA
TPCK	Sigma-Aldrich	Frankfurt am Main
Tween 20	Roth	Karlsruhe
Wortmannin	Sigma-Aldrich	Frankfurt am Main

Tab. 2.2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

### 2.2.2 Verwendete CpG-DNA Oligonukleotide

Name	Sequenz	Firma
2216 MB	5'-G*G*G GGA CGA TCG TC*G *G*G*G *G*G	TIB Molbiol, Berlin
2216 PD	5'-GGG GGA CGA TCG TCG GGG GG	
2216 PTO	5'-G*G*G *G*G*A *C*G*A *T*C*G *G*G*G *G*G	
2216-3' G-del	5'-GGG GGA CGA TCG TC	
2216-5' G-del	5'- A CGA TCG TCG GGG GG	
1668 PTO	5'-T*C*C *A*T*G *A*C*G *T*T*C *C*T*G *A*T*G *C*T	
1668 PD	5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT	
1668 MB	5'-G*G*T CCA TGA CGT TCC TGA TGC T*G*G *G*G*G *G	
2006 PTO	5' G*G*G*T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T	
2006 pG MB	5'-G*G* GGG TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT G*G*G* G*G*G	

\*= Phosphothioat-Verbindung

Tab. 2.3: Verwendete CpG-DNA Oligonukleotide und ihre Sequenzen

## 2.2.3 Medien und Medienzusätze

### 2.2.3.1 Medien

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Medien als Vollmedien mit allen Zusätzen verwendet.

Medium	Hersteller	Verwendete Zusätze
<b>RPMI-1640</b>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich; PAN Biotech GmbH, Aidenbach	2 mM L-Glutamin 0,05 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 10% FCS (hitzeinaktiviert) 100 u/ml Penicillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin
<b>DMEM</b> (high glucose)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich; PAN Biotech GmbH, Aidenbach	2 mM L-Glutamin 0,05 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 7,5% FCS

Tab.2.4: Verwendete Medien

FCS wurde je nach Bedarf vor der Zugabe in das Medium bei 56°C für 30 min im Wasserbad inkubiert (hitzeinaktiviert) um die darin enthaltenen Komplementproteasen zu inaktivieren.

### 2.2.3.2 Medienzusätze

Zusatz	Hersteller
FCS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
$\beta$ -Mercaptoethanol	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
L-Glutamin Penicillin Streptomycin	PAA Laboratories, GmbH, Pasching, Österreich

Tab. 2.5: Verwendete Medienzusätze

## 2.3 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter Laminar flow Arbeitsbänken der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt (Heraeus, Hanau). Die Zellen wurden in einem Inkubator (CO<sub>2</sub>-Inkubator, Heraeus, Hanau) bei 37°C, 7% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

### 2.3.1 Verwendetes Plastik

Plastikware	Hersteller, Firmensitz
14 ml Polystyren Rundboden-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
15 ml Polypropylen Spitzboden- Röhrchen, Cellstar®	Greiner bio-one, Frickenhausen
50 ml Polypropylen Spitzboden- Röhrchen, Cellstar®	Greiner bio-one, Frickenhausen
24 Well Platte	Nunc, Wiesbaden
96 Well Platte, Flachboden	Nunc, Wiesbaden
96 Well Platte, U-Boden	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflasche, 25 cm <sup>2</sup> mit Filterdeckel	BD Falcon™, Heidelberg
Zellkulturflasche, 75 cm <sup>2</sup> mit Filterdeckel	Greiner bio-one, Frickenhausen
15 cm Platten, PS mit 20 mm Netzraster	Becton Dickinson, Heidelberg
10 cm Petrischale	Nunc, Wiesbaden
5 ml Pipette, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
10 ml Pipette, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
25 ml Pipette, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsieb, steril, 70 µm, Nylon	BD Falcon™, Heidelberg

Tab. 2.6: Verwendete Plastikwaren für die Zellkulturen

#### Mediumvolumen der Kulturgefäße

Gefäß	max Volumen
96 well Platte	200 µl/well
Zellkulturflasche, 25 cm <sup>2</sup>	10 ml
Zellkulturflasche, 75 cm <sup>2</sup>	25 ml
15 cm Kulturplatte	20 ml
10 cm Kulturschale	10 ml

Tab. 2.7: Maximale Volumina in den Kulturgefäßen

### 2.3.2 Isolierung von murinen Knochenmark

Knochenmarkszellen stellen pluripotente Stammzellen dar, aus denen jede hämatopoetische Zelle generiert werden kann.

Knochenmarkszellen wurden bei der Maus aus Ober- und Unterschenkel isoliert. Dazu wurden der toten Maus beide Hinterbeine entnommen. Die Knochen von Fell, Fleisch und Sehnen gesäubert. Anschließend wurden alle Arbeiten unter Laminar flow Arbeitsbänken der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt.

---

#### Arbeitsanleitung zur Knochenmarks-Isolierung

---

1. Saubere Knochen in 70% Ethanol für 1-2 Minuten desinfizieren
  2. Desinfizierte Knochen mit ausgekochter Pinzette steril in frisches RPMI-1640 Medium überführen
  3. Zum Spülen der Ober- und Unterschenkel eine 30 ml Spritze mit frischem RPMI-1640 Medium befüllen und mit einer 24G, 1" Kanüle bestücken
  4. Mit ausgekochter Schere Knochen oben und unten aufschneiden, mit einer ausgekochten Pinzette über ein steriles 50ml *blue cap* halten, mit der Spritze solange die Markhöhle spülen bis der gesamte Knochen weiß erscheint, Knochen verwerfen
  5. Gesammelte Zellsuspension bei 1800 rpm für 7 min und 4°C zentrifugieren
  6. Überstand absaugen und das Zellpellet mit 0,5 ml NH<sub>4</sub>Cl/Maus resuspendieren und eine Minute bei RT inkubieren
  7. Erylyse-Reaktion durch Zugabe von mind. 20 ml RPMI-1640 abstoppen
  8. Zellen bei 1800 rpm für 7 min bei 4°C zentrifugieren und den Überstand verwerfen
  9. Resuspendieren der Zellen in 20 ml RPMI-1640 und mittels eines Zellsiebs von Knochensplittern reinigen.
  10. Zellsuspension nochmals zentrifugieren (1800 rpm, 7 min, 4°C) und den Überstand verwerfen
  11. Zellen mit 10 ml RPMI-1640 /Maus resuspendieren
- 

#### Bemerkungen:

- Als Medium wird ausschließlich RMI-1640 Vollmedium verwendet
- Zellen als Suspension im Medium können für mehrere Stunden auf Eis gelagert werden
- Nach der Erylyse sollte das Zellpellet hellrosa bis weiß sein

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl (s. 2.3.3).

### 2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in einem definierten Volumen resuspendiert. Um die toten Zellen sichtbar zu machen, wurden sie mit einem definierten Volumen Eosinlösung verdünnt. Eosin diffundiert in tote Zellen und färbt diese rot an, während lebende Zellen gelblich hell bleiben. Die Zellzahl wurde in einem Lichtmikroskop bei 40x Vergrößerung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer nach folgender Formel bestimmt:

$\text{Anzahl (Zellen/ml)} = \text{Zellen im Großquadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
--

#### Eosinlösung

Bestandteil	Menge	Hersteller
Eosin	2 g	Merk, Ismaning
Natriumazid	250 mg	Merk, Ismaning
Natriumchlorid (0,9%)	450 ml	Merk, Ismaning
FCS	50 ml	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

**Tab. 2.8: Zusammensetzung der Eosinlösung**

Die Reagenzien werden zusammen gerührt, durch einen Papierfilter filtriert und unsteril bei 4°C gelagert

### 2.3.4 Generierung von Makrophagen, plasmazytoiden und GM-CSF-DZ

#### **Verwendete Wachstumsfaktoren**

Wachstumsfaktor	Stammlösung	Endkonzentration im Versuchsansatz	Bezugsquelle
m-GM-CSF	-	1/10	Dr. T. Sparwasser (TU-München)
m-M-CSF	100 µg/ml	50 ng/ml	Pepro Tech, London, England
m-Flt3-Ligand	550 µg/ml	35 ng/ml	WEHI, Melbourne, Australien

**Tab. 2.9: Verwendete Wachstumsfaktoren zur Generierung von Makrophagen und Dendritischen Zellen**



### **Generierung von plasmazytoiden DZ**

Frisch isolierte Knochenmarkszellen wurden mit RPMI-1640 Vollmedium auf eine Konzentration von  $1,5 \times 10^6$ /ml eingestellt, mit 35 ng/ml Flt3-Ligand versetzt und auf Kulturflaschen mit Filterdeckel ausgesät. Die Kultivierung der Zellsuspension erfolgte liegend für 8-10 Tage im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 5% CO<sub>2</sub> und 37° C. Nach dieser Zeit lagen die gewünschten Zellen als Suspensionszellen vor und wurden nach mehrmaligen Spülen des Bodens mit dem Kulturmedium aus der Flasche pipettiert. Der Phänotyp der so generierten DZ (FL-BM DZ) wurde anschließend mittels Durchflußzytometrie (2.5) bestimmt.

### **Generierung von M-CSF Makrophagen**

Frisch isolierte Knochenmarkszellen wurden mit einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml mit 10 ml RPMI-1640 zusammen mit 50 ng/ml M-CSF in sterilen, 10 cm Petrischalen für Bakterienkulturen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Alle drei Tage wurde die Hälfte des Mediums abgesaugt und durch frisches Medium zusammen mit M-CSF ersetzt. Am Tag 8 der Kultur wurden die Zellen geerntet und der Phänotyp durchflußzytometrisch analysiert.

### **Generierung von GM-CSF Dendritischen Zellen**

Zur Generierung von Dendritischen Zellen mittels GM-CSF wurde Überstand einer GM-CSF Hybridomkultur verwendet, der freundlicherweise von Dr. T. Sparwasser (TU-München) zur Verfügung gestellt worden war.

Frisch isolierte Knochenmarkszellen wurden mit einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml mit 10 ml RPMI-1640 zusammen mit dem GM-CSF Hybridomüberstand in sterilen, 10 cm Petrischalen für Bakterienkulturen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle drei Tage wurde die Hälfte des Mediums abgenommen, die darin enthaltenen Zellen bei 1400 rpm, 5 min abzentrifugiert und mit frischem Medium plus GM-CSF Hybridomüberstand resuspendiert und der Kultur wieder zugeführt. Am Tag 8 der Kultur wurden die GM-CSF Dendritischen Zellen geerntet und der Phänotyp durchflußzytometrisch analysiert.

### 2.3.5 Stimulationen

Soweit im Text nicht anders angegeben, wurden die Stimuli mit den in Tab. 2.10. aufgeführten Konzentrationen eingesetzt

Stimulus	Eingesetzte Endkonzentration
CpG-DNA	1000 nM
HSV-1	$1 \cdot 10^7$ pfu
LPS	10 µg/ml
Pam3Cys	1 µg/ml
Poly (I:C)	100 µg/ml
R-848	1 µg/ml

**Tab. 2.10: Verwendete Stimuli und ihre Konzentrationen**

Die zu stimulierenden Zellen wurden mit einer maximalen Zellkonzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI-1640 Vollmedium auf 96 well Rundbodenplatten ausgesät (200 µl/well) und mit dem jeweiligen Stimulus versetzt. Die Stimulation erfolgte für mindestens 18 h bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C. Anschließend wurden die Kulturüberstände abgenommen und für Zytokinbestimmungen (ELISA) (2.4) verwendet. Die stimulierten Zellen wurden weiterverwendet und ihre Expression von Oberflächenmolekülen im Durchflusszytometer untersucht.

### 2.3.6 Passagieren von HEK 293 Zellen

Das Passagieren der HEK 293 Zellen erfolgte je nach ihrer Wachstumsgeschwindigkeit in Intervallen von zwei bis vier Tagen. Sobald die adhärent wachsenden Zellen einen konfluenten Rasen bildeten wurden sie in neue 15 cm Kulturschalen umgesetzt.

#### Nötige Medien und Lösungen:

- Medium: DMEM Vollmedium
- Trypsinlösung: 0,5 % Trypsin (PAN, Aidenbach)  
0,2 % EDTA  
in 500 ml PBS
- G418 Stammlösung: 100 mg/ml G418 gelöst in RPMI-1640 pur,  
mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, sterilfiltrieren  
bei -20°C lagern

### Arbeitsanleitung zum Passagieren von HEK 293 Zellen

---

1. Medium aus der Kulturschale absaugen
  2. 10 ml Typsinlösung auf Zellrasen pipettieren, bei 37°C wenige Minuten im Brutschrank inkubieren bis sich die Zellen deutlich sichtbar vom Boden ablösen
  3. Zum Abstoppen der Enzymreaktion 10 ml Medium zu den Zellen geben und Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführen
  4. Abzentrifugieren der Zellen bei 1400 rpm für 5 min, Überstand verwerfen
  5. Resuspendieren der Zellen in frischem Medium und nach Bedarf erneut auf 15 cm Kulturplatten aussäen.
- 

#### Bemerkung:

Die Kultivierung von HEK 293 Zellen, die stabil mit murinem TLR9 und dem Luziferase-Reporter-Vektor transfiziert waren, erfolgte ausschließlich mit der Zugabe von G418 (0,7 mg/ml) im Kulturmedium

## 2.4 ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay)

### 2.4.1 Prinzip

Zur Detektion von produzierten Zytokinen im Kulturüberstand wurde die Technik des „Sandwich-ELISA“ angewandt. Dazu wird ein spezifischer Antikörper der ein Epitop des gesuchten Zytokins erkennt in einem Mikrotiter-Well mit hoher Proteinbindungskapazität immobilisiert (*coating*). Nach Besetzen der restlichen freien Stellen auf der Plastikoberfläche mittels einer proteinhaltigen Lösung (*blocking*) wird die Probe zu den immobilisierten Antikörpern gegeben. Anschließend erfolgt die Bindung eines zweiten spezifischen Antikörpers, der ein anderes Epitop des gesuchten Antigens erkennt. Dieser zweite Antikörper (*detection*) ist entweder direkt mit einem Enzym gekoppelt, oder mit Biotin konjugiert. Die Enzymzugabe bei Biotin-gekoppelten Antikörpern erfolgt durch eine weitere Inkubation mit Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase. Zuletzt wird ein farbloses Substrat zu dem Antikörper-Enzym-Komplex gegeben und die entstehende Farbreaktion photometrisch gemessen. Wobei die Farbtintensität proportional ist zur Konzentration des Enzym-gebundenen Antikörpers und so auch zur Konzentration des gesuchten Antigens. Um die Qualität und Quantität der Proben bestimmen zu können muss eine Standardreihe mit einer definierten Menge an Protein mitgemessen werden.

## 2.4.2 Verwendete Materialien

### Verwendete ELISA-Systeme

#### **m IL-6**

Antikörper bzw. Nachweisprotein	Bezeichnung	Hersteller	Stammkonz.	Arbeitskonz.
Capture	Purified rat- $\alpha$ -mouse IL-6	BD PharMingen, Heidelberg	500 $\mu$ g/ml	2 $\mu$ g/ml
Detektion	Biotinylated rat- $\alpha$ -mouse IL-6	BD PharMingen, Heidelberg	500 $\mu$ g/ml	2 $\mu$ g/ml
Enzym	AMDEX™ streptavidin-HRP	Amersham Biosciences, Freiburg	1000 $\mu$ g/ml	0,2 $\mu$ g/ml
Standard	Rec- mouse IL-6	BD PharMingen, Heidelberg	1000 ng/ml	4 ng/ml

#### **m IFN- $\alpha$**

Capture	Rat- $\alpha$ -mouse IFN- $\alpha$ ,	PBL, New Brunswick, USA	1000 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml
Detektion	Rab- $\alpha$ -mouse IFN- $\alpha$	PBL, New Brunswick, USA	2000 units	2 units
Enzym	Donkey- $\alpha$ -rabbit-IgG-POX	Dianova GmbH, Hamburg	800 $\mu$ g/ml	0,1 $\mu$ g/ml
Standard	Rec-mouse Interferon- $\alpha$	HyCult Biotechnology, Uden, Niederlande	1x10 <sup>5</sup> units	1000 units

#### **m TNF- $\alpha$**

Capture	DuoSet® mTNF- $\alpha$ capture Antibody	R+D Systems Minneapolis, USA	54 $\mu$ g/ml	0,3 $\mu$ g/ml
Detektion	DuoSet® mTNF- $\alpha$ detection Antibody	R+D Systems Minneapolis, USA	144 $\mu$ g/ml	0,8 $\mu$ g/ml
Enzym	AMDEX™ Streptavidin-HRP	Amersham Biosciences, Freiburg	1000 $\mu$ g/ml	0,2 $\mu$ g/ml
Standard	DuoSet® mTNF- $\alpha$ Standard	R+D Systems Minneapolis, USA	100 ng/ml	4 ng/ml

#### **m IL-12p70**

Capture	Purified rat- $\alpha$ -mouse IL-12p70	BD PharMingen, Heidelberg	500 $\mu$ g/ml	500 ng/ml
Detektion	Biotinylated rat- $\alpha$ -mouse IL-12(p40/70)	BD PharMingen, Heidelberg	500 $\mu$ g/ml	333 ng/ml
Enzym	AMDEX™ Streptavidin-HRP	Amersham Biosciences, Freiburg	1000 $\mu$ g/ml	0,2 $\mu$ g/ml
Standard	Rec- mouse IL-12p70	BD PharMingen, Heidelberg	200 ng/ml	4 ng/ml

**Tab. 2.11: Verwendete ELISA-Systeme**

Die Lagerung der Reagenzien erfolgte nach Anweisung der Bezugfirmen

### Benötigtes Plastikmaterial

- 96 well Mikrotiterplatte MaxiSorp (Nunc, Wiesbaden)
- 14 ml Polystyren Rundboden-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg)
- 96 Well Verdünnungsplatte, U-Boden, unsteril (Nunc, Wiesbaden)
- 60 ml Plastikwanne, unsteril

### Verwendete Puffer und Lösungen:

- Coating-Puffer: PBS pur (PAA, Pasching, Österreich)
- Waschlösung: PBS+Tween20
- Blocking-Puffer: PBS+1% BSA
- Detektion-Puffer: PBS+1%BSA
- Verdünnungspuffer der Proben: PBS+1% BSA oder  
RPMI-1640 pur+10% FCS  
10 ml 0,1 M Zitronensäure pH 4,2
- ABTS Substratlösung für 1 Platte: 10 µl 20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Roth, Karlsruhe)  
0,2 ml 50x ABTS (Sigma-Aldrich, Frankfurt)

## **2.4.3 Durchführung**

### Arbeitsanleitung für eine ELISA-Platte

---

1. Capture Antikörper in der gewünschten Konzentration mit 6 ml PBS verdünnen und 50 µl / well in eine MaxiSorp NUNC Platte pipettieren
2. Die Platte entweder über Nacht bei 4°C, oder für 2 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren
3. Im Anschluss an das „coaten“ die Platte 3-mal mit PBS+Tween 20 im ELISA-Wascher waschen
4. Platte trocken klopfen und mit 200 µl / well PBS+1% BSA alle freien Bindestellen im well mit Protein absättigen, 2 h in feuchter Kammer inkubieren
5. Mikrotiterplatte 3 mal mit PBS+Tween 20 waschen und trocken klopfen
6. 50 µl / well Probe bzw. Standard-Verdünnung auf die Platte geben, ÜN bei 4°C in feuchter Kammer inkubieren
7. Platte 3-mal waschen und trocken klopfen
8. 50 µl / well des Detektion Antikörpers in gewünschter Konzentration zugeben, 2 h in feuchter Kammer inkubieren
9. Platte 3-mal waschen und trocken klopfen

10. 50  $\mu\text{l}$  / well Enzymlösung in gewünschter Konzentration zugeben, 2 h in feuchter Kammer inkubieren
  11. Platte 6-mal waschen und trocken klopfen
  12. 100  $\mu\text{l}$  / well ABTS zugeben, je nach Bedarf einige Minuten im Dunkeln inkubieren und im Microplate-Reader bei 405 nm messen
- 

Bemerkungen:

- Alle Schritte wurden falls nicht anders vermerkt bei Raumtemperatur durchgeführt.

## 2.5 Durchflusszytometrie

### 2.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen mittels eines FACS (fluorescence-activated cell sorters) anhand ihrer Oberflächenmoleküle unterschieden werden. Dazu werden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ein bestimmtes Oberflächenantigen markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch einen Laserstrahl geführt. Dabei werden die Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt und zelluläre Eigenschaften der Probe wie Zellgröße, Form und Granularität führen zu einer zusätzlichen Lichtstreuung. Das in einem geringen Winkel ( $3\text{-}10^\circ$ ) gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) bezeichnet und gibt im Wesentlichen die Zellgröße wieder. Das um  $90^\circ$  reflektierte Licht wird als Seitwärtsstreulicht bezeichnet (sideward scatter, SSC) und wird durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Das emittierte Fluoreszenzlicht von der Oberflächenmarkierung der Zellen wird in einer Linse gesammelt und durch Filter nach Wellenlängenbereichen aufgeteilt und an verschiedene Detektoren weitergeleitet. So können mehrere verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig bei einer Mehrfachfärbung gemessen werden. Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzen gelingt nicht vollständig, da sich Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überschneiden. Diese Überschneidung wird durch die so genannte Kompensation korrigiert.

Verwendete fluoreszenzmarkierte Antikörper

Spezifität	Markierung	Hersteller
anti-mouse CD8 $\alpha$	FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse CD11a	FITC	
anti-mouse CD11b	FITC	
anti-mouse CD11c	APC	
anti-mouse CD25	FITC	
anti-mouse CD40	PE	
anti-mouse CD44	FITC	
anti-mouse CD45R (B220)	PE /APC	
anti-mouse CD45RA	PE / FITC	
anti-mouse CD45RB	FITC	
anti-mouse CD54	FITC	
anti-mouse CD62L	FITC	
anti-mouse CD69	FITC	
anti-mouse CD71	FITC	
anti-mouse CD80	FITC	
anti-mouse CD86	FITC	
anti-mouse Ly6G (GR-1)	FITC	

Tab. 2.12: Verwendete Antikörper zur Markierung von Oberflächenmolekülen

## 2.5.2 Färbung und Analyse von Zelloberflächenmolekülen

Eingesetzte Verdünnungen der verwendeten Antikörper

Markierung	Verdünnung	Antikörper-Stammkonzentration	Antikörper-Arbeitskonzentration
FITC	1/100	500 $\mu$ g/ml	5 $\mu$ g/ml
APC	1/200	500 $\mu$ g/ml	2,5 $\mu$ g/ml
PE	1/200	500 $\mu$ g/ml	2,5 $\mu$ g/ml

Tab. 2.13: Eingesetzte Verdünnungen der fluoreszenzmarkierten Antikörper

Verdünnungen der Antikörper erfolgten stets in MACS-Puffer

- MACS-Puffer:
- 2 mM EDTA
  - 3 % FCS
  - in 500 ml PBS

Arbeitsanleitung zur Färbung von Oberflächenmolekülen

1. Bis zu  $1 \times 10^6$  Zellen pro Färbeansatz aus der Kultur mit 8000 rpm, 5 min bei RT zentrifugieren, Kulturüberstand abnehmen
2. Zellpellet mit 1 ml MACS-Puffer resuspendieren, erneut mit 8000 rpm, 5 min bei RT zentrifugieren, Überstand verwerfen
3. Zellpellet mit 20  $\mu$ l der verdünnten Antikörper-Färbelösung resuspendieren
4. Färbeansatz für 30 min, auf Eis, abgedunkelt inkubieren
5. 1 ml MACS-Puffer zur Färbung geben, mit 8000 rpm, 5 min bei RT zentrifugieren, Überstand verwerfen
6. Gefärbte Zellen mit 300  $\mu$ l MACS-Puffer+ Propidium Jodid [500 ng/ml] resuspendieren und in ein Messröhrchen überführen
7. Probe bis zur Messung dunkel auf Eis lagern

Bemerkungen:

- Ab Schritt 5 erfolgten alle Arbeitsschritte so dunkel wie möglich
- Propidium Jodid wurde zugesetzt, um tote Zellen zu markieren

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurde ein FACS Calibur (BD, Heidelberg) mit einem 488 nm Argonlaser und einem zweiten, 635 nm roten Dioden-Laser verwendet. Tab. 2.14 zeigt die Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Markierungen. Die Auswertungen der Messungen erfolgte mit den Softwares WEASEL (WEHI, Melbourne, Australien) und CellQuest Pro (BD, Heidelberg). Die Daten wurden entweder als Punktdiagramme (*dot plots*) oder als Histogramme dargestellt. Durch das Setzen von Analysefenstern kann die Expressionsanalyse einzelner Oberflächenantigene auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt werden (*gaten*).

Fluoreszenzkanal	Farbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
FL1	FITC	495 nm	519 nm
FL2	PE	480 nm/565 nm	578 nm
FL3	Propidium Jodid	536 nm	614 nm
FL4	APC	650 nm	660 nm

Tab. 2.14: Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe





## 2.7 Affymetrix Genechip® Array

Die in diesem Abschnitt beschriebene Methode wurde, bis auf die RNA-Isolierung, im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. R. Lang (TU-München) durchgeführt und ausgewertet.

### 2.7.1 Allgemeines Prinzip

Die GeneChip®-Technologie (Affymetrix, Santa Clara, USA) ermöglicht Genexpressionsstudien von gleichzeitig mehreren tausend Genen und beruht auf der komplementären Basenpaarung von Nukleotidsequenzen. Die Affymetrix-Microarrays sind kleine Glasträger (1,3 cm x 1,3 cm), auf deren Oberfläche bis zu 300.000 cDNA-Proben (Sonden) aufgebracht sind. Der Array wird mit der zu testenden, markierten Nukleinsäurprobe versetzt, inkubiert und gewaschen. Nur mRNA von exprimierten Genen führt zu einer Bindung an der komplementären Sonde. Durch die zuvor durchgeführte fluoreszierende Markierung der RNA kann so mittels eines Lasers die Expression von Genen nachgewiesen werden.

#### Einzelne Schritte einer Microarray-Analyse :

1. Isolierung der gesamt RNA aus der zu untersuchenden Zellpopulation
2. Reverse Transkription der RNA zu cDNA
3. *In vitro* Transkription der cDNA zu cRNA unter Einbau markierter Nukleotide
4. Fragmentierung der markierten Probe
5. Hybridisierung der Probe auf den Microarray, anschließend Waschen
6. Scannen des Microarrays und Analyse der Daten

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software MAS 5.0 (Affymetrix, Santa Clara, USA)

### 2.7.2 Präparation der Gesamt-RNA

#### Verwendete Verbrauchsmaterialien

- RNA-Isolations Kit: Qiagen RNeasy Kit (Qiagen, Hilden)
- RNase freie DNase: Qiagen, Hilden,
- *RNase away*: Roth, Karlsruhe

Aus stimulierten Zellen wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des Qiagen RNeasy Kits streng nach Vorschrift des Herstellers isoliert. Zusätzlich wurde eine DNase Behandlung

durchgeführt. Die isolierte RNA wurde in 30 µl Wasser aufgenommen. Alle Gebrauchsgegenstände wurden vor Benutzung mit *RNase away* gesäubert.

## 2.8 Methoden zur Zelltrennung

### 2.8.1 MACS

(Magnetische Zellsortierung= magnetic activated cell sorting)

Bei der Zelltrennung nach dem MACS Prinzip wurde die Zellsuspension zuerst mit FITC-markierten Antikörpern gegen ein spezifisches Oberflächenmolekül gefärbt und im Anschluss daran mit Antikörpern gegen FITC die zusätzlich an magnetische Microbeads gekoppelt waren inkubiert. Die markierte Zellsuspension wurde auf eine magnetische Trennsäule (LS-Säule, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) gegeben, die in einem Magnetfeld platziert war. Alle FITC-positiven und somit auch an magnetischen Microbeads gekoppelten Zellen wurden in der Matrix zurückgehalten, während die FITC negativen Zellen durch Spülen aus der Säule entfernt werden konnten. Um die gebundene Zellpopulation von der Säule waschen zu können, wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die Zellen aus der Säule eluiert. Sowohl die markierte, als auch die unmarkierte Zellfraktion wurden im Anschluss für Zellkulturexperimente eingesetzt.

Die Färbung der Zellen mit den FITC-markierten Antikörpern erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben. Die gesamte Aufreinigung der markierten Zellen erfolgte streng nach den Angaben des Systemherstellers Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach.

#### Verwendete Materialien zur MACS Zellaufreinigung

- |                           |   |                                     |
|---------------------------|---|-------------------------------------|
| • Oberflächenantikörper:  | anti-m-CD11c-FITC<br>anti-m-CD45R (B220)-FITC<br>anti-m-CD19-FITC | BD Pharmingen, Heidelberg           |
| • Microbeads:             | anti-FITC-Microbeads  | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach |
| • Verwendete Säulen:      | LS-Säulen, gelagert bei 4°C                                       | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach |
| • Wasch- und Färbepuffer: | MACS Puffer (s. 2.5.3)  |                                     |

## 2.8.2 Zellsortierung am High-Speed-Cell-Sorter MoFlo® (Modular Flowcytometer)

### Prinzip:

Bei dieser Methode zur Aufreinigung einzelner Zellpopulationen aus einer gemischten Zellkultur wurden die Zellen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmoleküle wie unter 2.5.3 beschrieben gefärbt. Jedoch betrug auf Grund der großen Zellzahl hier das Färbevolumen: ca.  $1 \times 10^7$  Zellen / 100  $\mu$ l Färbelösung und auch die Menge an verwendeten MACS Puffer beim Waschen der Färbung wurde je nach Zellzahl erhöht. Die Konzentration der Zellsuspension betrug am Ende der Färbung und dem Resuspendieren mit MACS-Puffer+Propidium Jodid nicht mehr wie  $1 \times 10^8$  Zellen/ml. Die Zellsuspension wurde mittels eines MoFlo® Gerätes in die unterschiedlichen Populationen getrennt.

Bei dieser Art Zelltrennung werden die Zellen in einer Trägerflüssigkeit vereinzelt und durch eine Düse geschickt. Der Flüssigkeitsstrahl wird in definierte Einzeltropfen aufgespaltet, welche jeweils eine Zelle enthalten. Unterhalb der Düse liegt der Laser, der die fluoreszierende Markierung der passierenden Zelle anregt und das optische Signal wird in Photomultiplern registriert. Diese optischen Signale werden in digitale Signale umgewandelt und auf dem Computerbildschirm dargestellt. Die abzutrennende Zellpopulation wird mittels der Software markiert („gated“) und die Sortdefinitionen bestimmt. Beim Sortieren wird der Tropfen Trägerflüssigkeit der eine gewünschte Zelle enthält mit einer elektrischen Ladung belegt und es erfolgt beim anschließenden Durchfliegen eines elektrischen Feldes zwischen geladenen Ablenkplatten eine seitliche Ablenkung in Röhrchen mit jeweils 700  $\mu$ l vorgelegtem FCS.

Die Bedienung des Sortgerätes erfolgte durch Dr. M Schiemann (TU-München).

### Typische Färbung einer gemischten FL-BM Zellkultur zur Trennung der pDZ und cDZ

#### Fraktion:

Anti-m-CD11c-APC  
Anti-m-CD11b-FITC  
Anti-m-CD45RA-PE

### 3. Ergebnisse

1999 wurde durch die Arbeiten von Siegal, *et al.* und Cella, *et al.* gezeigt, dass die bis dahin beschriebenen „Natürlichen Interferon produzierenden Zellen (=natural Interferon producing cells; NIPC) und die plasmazytoiden Monozyten identisch sind. Seit dem werden diese Zellen plasmazytoide DZ (pDZ) genannt.

Da die Maus das bevorzugte experimentelle Tiersystem für immunologische Fragen darstellt, wurde nach dem murine Äquivalent der humanen pDZ gesucht und Ende 2001 publiziert [Asselin-Paturel, 2001; Bjorck, 2001; Nakano, 2001]. Wenige aber signifikante Unterschiede zwischen humanen und murinen pDZ hatten die Identifizierung erschwert. Zum einen zeigte sich, dass murine pDZ den IL-3 Rezeptor alpha (CD123) nur schwach exprimieren, welcher für humane pDZ als Markermolekül verwendet wurde. Eine andere Schwierigkeit war die Expression des B-Zell typischen Markers B220 in murinen pDZ. Da dieses Antigen verwendet wurde um bei der DZ Aufreinigung B-Zellen aus Zellsuspensionen zu depletieren wurden auch die pDZ mit verworfen. Die Verwendung von CD19 anstatt von B220 ermöglichte letztendlich sowohl konventionelle als auch pDZ gleichzeitig aus Organen zu isolieren. Für viele andere phänotypische Marker besteht aber eine bemerkenswerte Homologie zwischen humanen und murinen pDZ [Hochrein, 2002]. Wichtig war auch, dass eine zentrale Eigenschaft, nämlich auf bestimmte mikrobielle Stimuli hin große Mengen von Typ I Interferon zu produzieren, zwischen humanen und murinen pDZ konserviert war. Somit lassen sich mit den murinen pDZ wichtige immunologische Fragen bezüglich der humanen pDZ beantworten.

Wie andere DZ-Subpopulationen stellen auch pDZ nur eine sehr kleine Population im Säugetierorganismus dar und konnten in verschiedenen lymphoiden und nicht-lymphoiden Organen wie z.B.: Knochenmark, Thymus, Milz, Lymphknoten, Blut, oder Leber identifiziert werden. Aufgrund der aufwendigen Isolierungsmethoden zur Gewinnung von großen Zahlen von pDZ war es wünschenswert ein Kultursystem zur Generierung von murinen pDZ aus Vorläuferzellen zu etablieren.

#### 3.1 Generierung von plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDZ) mit Flt3-Ligand

Es war bekannt, dass im humanen Organismus die Injektion von Flt3-Ligand (Flt3-L) die Anzahl an pDZ im Blut signifikant erhöht [Pulendran, 2000] und dass sich aus CD34+ humanen Stammzellen, durch Zugabe von Flt3-L, Interferon produzierende Zellen (IPZ) generieren ließen [Blom, 2000]. Diese Studien wiesen darauf hin, dass es möglich wäre auch

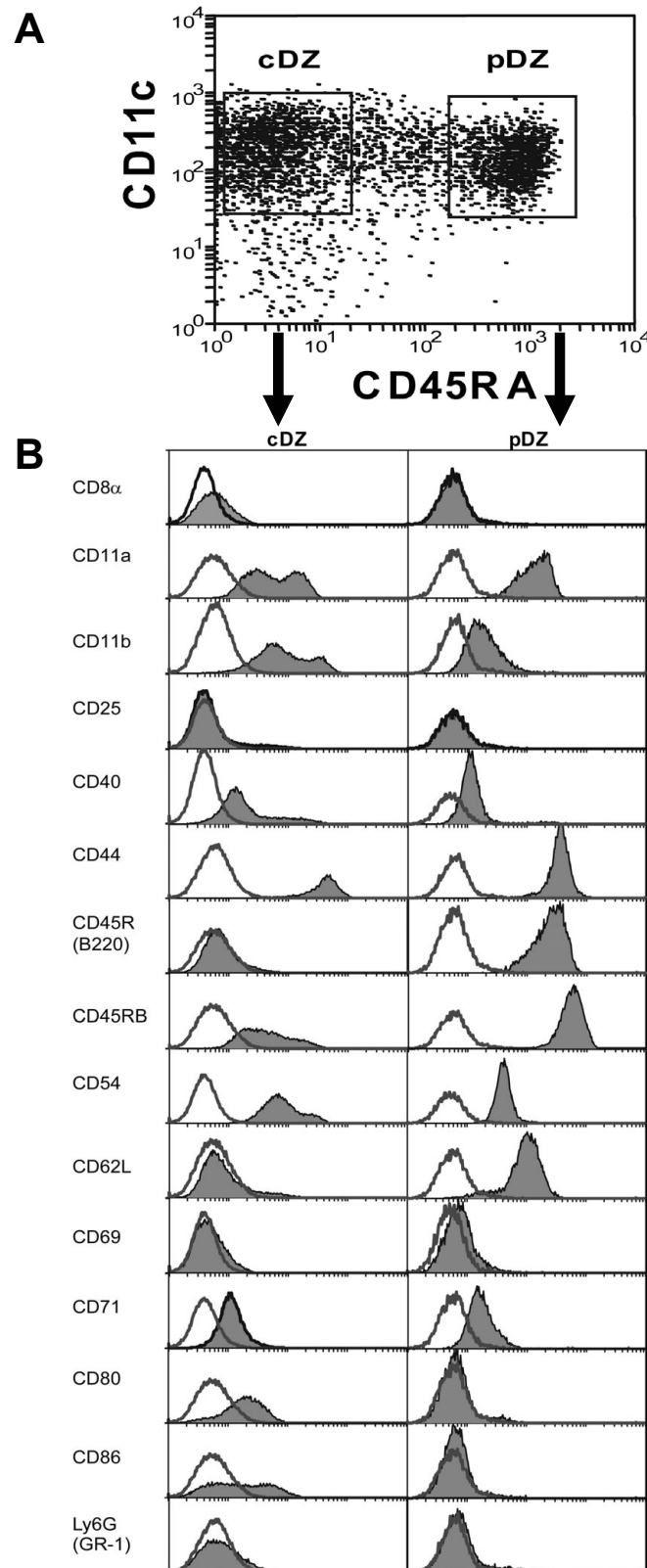
aus murinen Vorläuferzellen durch Flt3-L pDZ zu generieren. Zu diesem Zweck wurden frisch isolierte Knochenmarkszellen aus der Maus mit Flt3-L versetzt und die resultierenden Zellen an verschiedenen Tagen der Kultur mit verschiedenen Stimuli inkubiert und die Zellkulturüberstände auf das Zytokin IFN- $\alpha$  hin analysiert. Es zeigte sich, dass FL-BM Kulturen zwischen Tag 8 – 10 auf CpG-DNA Stimulation IFN- $\alpha$  produzierten. Die Hypothese war, dass in Analogie zum Humansystem murine pDZ die Quelle für CpG-DNA induziertes IFN- $\alpha$  sein würde. Da mit Flt3-L anscheinend pDZ generiert werden konnten wurden nun anschließend umfangreiche phänotypische Analysen durchgeführt.

### 3.1.1 Phänotyp der Kulturzellen (FL-BM DZ)

#### Expression von Oberflächenmolekülen

Die phänotypische Analyse der generierten FL-BM Kulturzellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (s. 2.5) unter der Verwendung von Fluoreszenz markierte Antikörpern, mit besonderem Augenmerk auf Antikörper, welche für murine, konventionelle DZ oder humane pDZ beschrieben wurden. Die Analyse der erhaltenen FL-BM Zellen ergab, dass ca. 95% aller Suspensionszellen am Tag 9 der Kultur CD11c exprimierten. CD11c wird als typischer Marker für murine Dendritische Zellen verwendet. Es zeigte sich, dass die Kulturen zwei große, unterschiedliche Population enthielten. Die eine war CD11c<sup>pos</sup>, CD45RA<sup>hoch</sup>, CD11b<sup>niedrig</sup>, die andere Population war dagegen CD11c<sup>pos</sup>, CD45RA<sup>negativ</sup>, CD11b<sup>hoch</sup>. Da humane pDZ als CD45RA<sup>hoch</sup> und CD11b<sup>negativ</sup> charakterisiert worden waren, war anzunehmen, dass es sich bei der CD45RA<sup>hoch</sup>, CD11b<sup>niedrig</sup> Population in den FL-BM Kulturen um das murine Äquivalent der humanen pDZ handelte. Die Analyse der IFN- $\alpha$  Produktion der durch Zell-Sortierung isolierten Populationen bestätigte diese Annahme (s. 3.1.2). Somit konnten in den gemischten FL-BM Kulturen anhand dieser Marker sowohl die pDZ als auch cDZ identifiziert werden (Abb. 3.1 A). Diese Zellen wurden anhand der Expression weiterer Oberflächenmarker besser charakterisiert.

Von besonderem Interesse waren dabei Marker, die zur Unterteilung einzelner DZ-Subpopulationen herangezogen werden und solche, die *ex vivo* zur Identifikation der plasmazytoiden DZ führten [Asselin-Paturel, 2001; Bjorck, 2001; Nakano, 2001; Nikolic, 2002; O'Keefe, 2003]: CD8 $\alpha$ , CD11a, CD11b, CD45R (B220), CD45RB und Ly6G (GR-1). Zusätzlich wurde noch die Expression von Aktivierungsmarkern und kostimulatorischen Molekülen wie CD25, CD40, CD54, CD62L, CD69, CD80 und CD86 untersucht (Abb. 3.1 B).



**Abb. 3.1: Phänotypische Analyse der FL-BM Kulturzellen:** (A) Charakteristische CD11c / CD45RA Expression der Knochenmarkszellen nach 10 Tagen Kultivierung in Gegenwart von 35 ng/ml Flt3-L. Unterteilung in konventionelle DZ (cDZ) und plasmazytoide DZ (pDZ) aufgrund ihrer unterschiedlichen Expression von CD45RA. (B) Expression weiterer Oberflächenmarker aufgetrennt nach cDZ und pDZ. Leere Kurven zeigen die Färbung mit dem Isotypkontroll-Antikörper oder die ungefärbte Kontrolle (nur bei CD40). Gefüllte Kurven stellen die Färbung mit dem angegebenen Antikörper dar

*Ex vivo* isolierte murine pDZ exprimieren den klassischen B-Zell-Marker CD45R (B220). Von den *in vitro* generierten pDZ wird dieser Marker ebenfalls sehr stark exprimiert. Von cDZ, sowohl *ex vivo* isolierte als auch *in vitro* generierte, jedoch nicht. Ebenfalls den *ex vivo* Isolaten entsprechend exprimieren die *in vitro* generierten pDZ mehr CD45RB als die cDZ. Beiden Populationen der Kultur gemeinsam ist die Expression von CD11a auf ihrer Oberfläche.

Der Marker Ly6G (GR-1), der verwendet wurde, um plasmazytoide DZ *ex vivo* zu identifizieren [Asselin-Paturel, 2001; Nakano, 2001], konnte auf Kulturzellen die von dem Mausstamm C57BL/6 stammten nicht nachgewiesen werden. Auf Kulturzellen der Mausstämme BALB/c oder SV129 war dieser Marker jedoch nachweisbar. Dieser Stamm-spezifische Unterschied konnte auch für *ex vivo* isolierte pDZ aus der Milz von C57BL/6 und BALB/c Mäusen nachgewiesen werden. So scheint die GR-1 Expression der pDZ bei unterschiedlichen Mausstämmen zu variieren.

Im Gegensatz zu frisch isolierten pDZ aus Knochenmark, Milz, Thymus oder Lymphknoten exprimieren die *in vitro* generierten pDZ CD8 $\alpha$  nur nach Aktivierung (Abb. 3.1 und 3.2). Ebenfalls nicht oder kaum exprimiert werden auf den FL-BM Kulturzellen Aktivierungsmarker wie CD40 und CD69 und kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86. Das Selektin CD62L (L-Selektin) ist auf nicht aktivierten, Kultur generierten pDZ auf der Oberfläche nachweisbar (Abb. 3.1 B).

### **Änderung der Oberflächenmarker nach Stimulation**

Nach der phänotypischen Analyse der naiven, nicht aktivierten Kulturzellen, war es wichtig, die phänotypischen Änderungen cDZ und pDZ nach Stimulation zu definieren. Hier sind exemplarisch die Änderungen nach Inkubation mit der antiviralen Substanz Resiquimod (R-848) [1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] gezeigt, allerdings wurden die gleichen Profile auch mit CpG-ODN Stimulation erreicht. R-848 wurde uns im Zuge einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. S. Bauer freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Da bekannt war, dass R-848, als Virustatikum eingesetzt, IFN- $\alpha$  induziert war es attraktiv diese Substanz auch als potentiellen Stimulus für die FL-BM DZ zu testen. Für die Stimulation wurden  $2,5-1,5 \times 10^6/\text{ml}$  Zellen verwendet und für mindestens 18 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers die Regulation von CD8 $\alpha$ , verschiedenen Aktivierungsmarkern sowie kostimulatorischen Molekülen auf den definierten Populationen (pDZ und cDZ) nach der Stimulation analysiert. (Abb. 3.2).

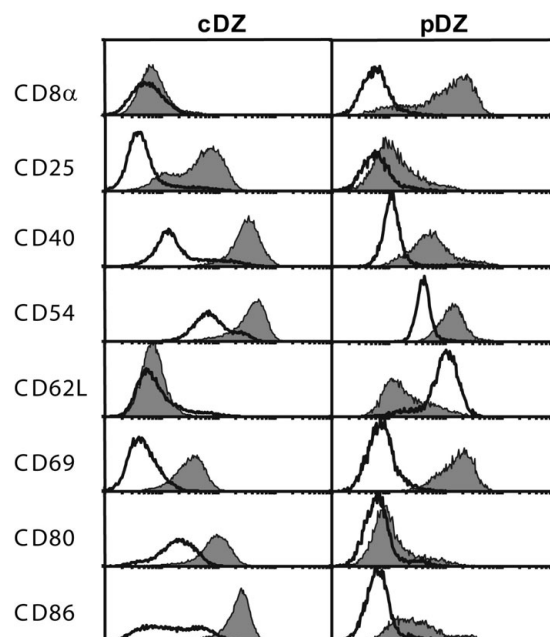


Es wurde deutlich, dass CD8 $\alpha$  durch die Stimulation auf den meisten pDZ hochreguliert wurde, während sich bei den cDZ keine Expressionsänderung zeigte.

Genau der gegenteilige Effekt konnte bei den Markern CD25 und CD80 beobachtet werden. Sowohl CD25, als auch CD80 wurden von pDZ auch nach Stimulation nur schwach exprimiert. Die cDZ hingegen exprimierten diese Marker sehr stark.

CD62L, war einer der wenigen Moleküle welches auf unstimulierten pDZ stark auf der Oberfläche anfärbar, nach einer Stimulation jedoch kaum nachweisbar ist. PDZ zeigen damit das gleiche CD62L Aktivierungsmuster wie Lymphozyten bei denen nach Aktivierung CD62L enzymatisch von der Oberfläche entfernt wird. Die cDZ tragen CD62L weder vor noch nach einer Stimulation (Abb. 3.2).

Die Expression der Marker CD40, CD54, CD86 wird von beiden Populationen nach Stimulation erhöht. Auffällig ist, dass die pDZ nach dieser relativ kurzen Stimulationszeit von 18 h sowohl CD80 als auch CD86 in sehr viel geringerem Grad auf der Oberfläche tragen wie die cDZ (Abb.3.2). Dieser Unterschied wurde geringer, wenn die Zellen länger stimuliert wurden. Dies deutet daraufhin, dass die *in vitro* generierten pDZ länger benötigen um diese kennzeichnenden Moleküle der antigenpräsentierenden Zellen auf ihrer Oberfläche zu exprimieren.



**Abb. 3.2:** Änderung der Expression von Oberflächenmarkern von pDZ und cDZ innerhalb der Gesamt-FL-BM Kulturzellen nach Stimulation mit R-848. Die Expression der Marker auf unstimulierten Zellen werden durch leere Kurven dargestellt, gefüllte Kurven zeigen die Expression nach Stimulation.

**Effekte der Liganden für TLR2, -3, -4, -7 und -9 auf den Phänotyp von FL-BM pDZ und cDZ**

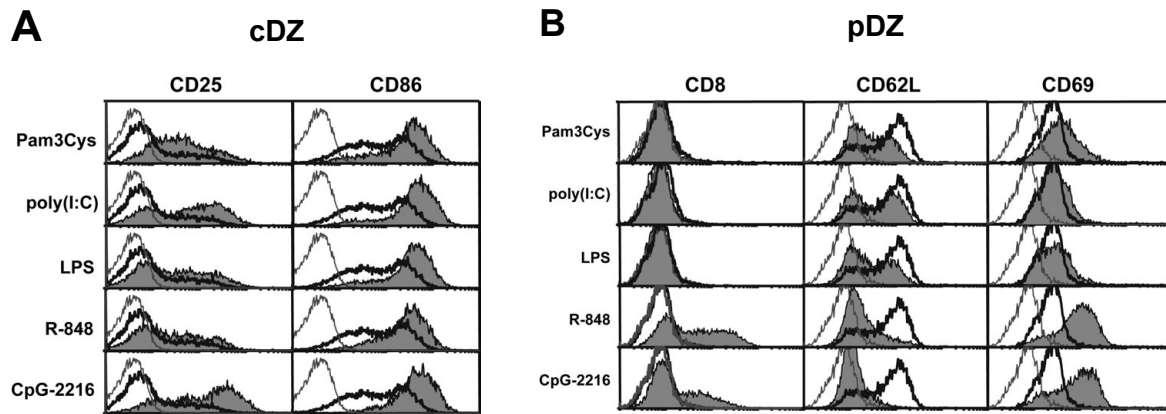
Anhand von messenger-RNA Expressions-Mustern für TLRs von humanen pDZ, wurde gezeigt, dass humane pDZ lediglich TLR7 und TLR9 exprimieren [Kadowaki, 2001; Hornung, 2002]. Das beschriebene Expressionsmuster für murine pDZ ist nicht ganz so eingeschränkt. Es wurde gezeigt, dass in der Maus neben der sehr starken Expression von TLR7 und TLR9 auch TLR2, TLR3 und TLR4 schwach exprimiert werden. [Brawand, 2002; Okada, 2003; Edwards, 2003]. Jedoch war nicht klar, ob diese geringe Expression in den Zellen auch funktionelle Relevanz besitzt.

Da auf den pDZ in der Gesamtkultur nach Stimulation mit R-848 Veränderungen in der Expression von Oberflächenmolekülen beobachtet werden konnte, war es wichtig zu analysieren, ob diese Regulation direkt durch Signale auf die pDZ erfolgte, oder ob es sich um einen indirekten Effekt handelte, der durch die aktivierten cDZ mediiert wurde. Dazu wurden die generierten Kulturzellen mittels eines Zellsortierers in zwei Populationen getrennt. Als Grundlage für die Separation dienten die Marker CD11c, CD45RA und CD11b. Die cDZ wurden definiert als CD11c<sup>pos</sup>/CD45RA<sup>neg</sup>/CD11b<sup>pos</sup>, die pDZ als CD11c<sup>pos</sup>/CD45RA<sup>high</sup>/CD11b<sup>neg-low</sup>. Um die toten Zellen auszuschließen, wurde zusätzlich Propidium Jodid (PI) zur Separation verwendet.

Die beiden DZ-Populationen wurden getrennt von einander mit den Liganden für TLR2 (Pam3Cys), TLR3 (poly I:C), TLR4 (LPS), TLR7 (R-848) und TLR9 (CpG-2216) stimuliert und die Veränderungen von Oberflächenmolekülen mittels eines Durchflusszytometers analysiert.

Die reinen cDZ reagierten auf alle TLR-Liganden mit der Hochregulation von CD86 im gleichen Maße. Die Expression von CD25 hingegen war etwas heterogener. Der Ligand für TLR9, CpG-ODN 2216, stellte sich jedoch als der beste Stimulus heraus, um die Expression von CD25 auf der Zelloberfläche zu induzieren (Abb.3.3).

Die reine pDZ-Population reagierte nur mit den Stimuli R-848 und CpG-2216 mit der Hochregulation von CD8 und CD69 und mit der Herabregulation von CD62L. Keine Veränderungen in der CD8 Expression konnte beobachtet werden, wenn als Stimulus Pam3Cys, Poly(I:C) oder LPS verwendet wurde. Da nach Inkubation mit diesen TLR-Liganden aber zumindest eine schwache Hochregulation von CD69, bzw. eine schwache Herabregulation von CD62L zu detektieren war, muss davon ausgegangen werden, dass murine, *in vitro* generierte pDZ doch eine schwache aber funktionelle Expression der TLR Moleküle TLR2, -3 und -4 besitzen. (Abb. 3.3).



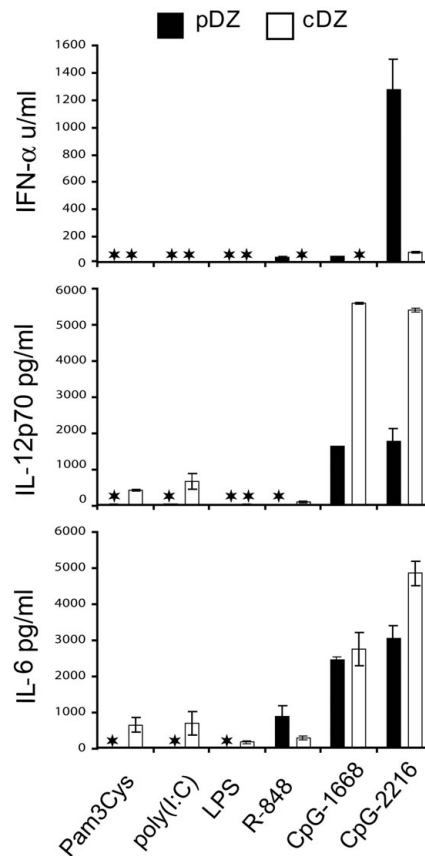
**Abb. 3.3: Expression von Oberflächenmarkern von abgetrennten cDZ und pDZ aus der FL-BM-Kultur nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden.** *In vitro* generierte cDZ (A) und pDZ (B) wurden getrennt von einander mit Pam3Cys [1 µg/ml], poly I:C [100 µg/ml], LPS [10 µg/ml], R-848 [1 µg/ml] und CpG-2216 [0,5 µM oder 1 µM] für 17 h stimuliert (graue, gefüllte Linie) oder unstimuliert inkubiert (dicke, ungefüllte Linie). Die Veränderungen der angegebenen Oberflächenmoleküle wurden anschließend mittels FACS analysiert. Die ungefärbte Kontrolle ist jeweils durch eine dünne, leere Linie angegeben.

### 3.1.2 Zytokinproduktion der FL-BM pDZ und cDZ

Neben der Expression von Oberflächenmolekülen auf der Zelloberfläche nach Stimulation war es ebenfalls wichtig die Zytokinproduktionskapazität dieser *in vitro* generierten FL-BM DZ zu analysieren. Zu diesem Zweck wurde die Gesamtkultur erneut mit der Hilfe eines Zellsortierers in pDZ und cDZ getrennt. Die getrennten Populationen wurden dann mit den Liganden für TLR2-4, TLR7 und TLR9 stimuliert. Nach 20-24 h Stimulation wurde der Kulturüberstand abgenommen und mittels ELISA die Zytokinproduktion gemessen. Um IFN- $\alpha$  und IL-6 messen zu können, wurde der Stimulation zusätzlich IL-3 beigefügt, was für humane pDZ als Überlebensfaktor beschrieben worden war.

Für die IL-12p70 Produktion erfolgte die Stimulation in der Gegenwart eines Zytokincocktails von IL-4, GM-CSF und IFN- $\gamma$ , welcher für murine und humane DZ als optimales IL-12p70 Kostimulanz beschrieben worden war [Hochrein, 2000].

Sowohl die pDZ, als auch die cDZ reagierten als Antwort auf die Stimulation mit R-848 (TLR7-Ligand) und beide Typen der CpG-ODN 1668 und 2216 (TLR9-Liganden) mit der Produktion von IL-6. Im Gegensatz zu der IL-6 Produktion auf Pam3Cys (TLR2), poly(I:C) (TLR3) und LPS (TLR4), die in diesem Fall ausschließlich von den cDZ-Population stammte. Allerdings sollte erwähnt werden, dass die pDZ-Fraktion ebenfalls in der Lage war etwas IL-6 auf die Liganden von TLR2-4 zu produzieren, wenn die Stimulation mindestens zwei Tage dauerte. Was wiederum zeigt, dass diese Zellen nicht komplett immunologisch „stumm“ auf die Liganden von TLR2-4 waren (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4: Zytokinproduktion getrennter pDZ und cDZ aus der FL-BM Kultur nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden.**  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml wurden mit dem jeweils angegebenen TLR-Ligand für 20-24 h stimuliert. Weiße Balken stellen die Zytokinproduktion der cDZ, schwarze Balken die Produktion der pDZ, dar. Nicht detektierbare Mengen sind durch Sterne gekennzeichnet.

Bei IL-12p70 zeigte der Vergleich zwischen pDZ und cDZ, dass beide Populationen als Antwort auf CpG-ODN in der Lage sind das Zytokin zu produzieren. Die cDZ produzieren aber das fünffache an IL-12p70 als die pDZ. Dieser Unterschied blieb auch erhalten, wenn man den zusätzlichen Zytokincocktail (IL-4+GM-CSF+IFN- $\gamma$ ) in der Stimulation wegließ. Die cDZ reagierten zudem mit IL-12p70 Produktion auf Pam3Cys und poly(I:C).

Für die IFN- $\alpha$  Produktion zeigte sich, dass nur die pDZ in der Lage sind große Mengen von diesem Typ I Interferon zu bilden. Interessanter Weise gilt dies aber nur für das CpG-ODN 2216 und nicht für das CpG-ODN 1668 und R-848. Obwohl beide Stimuli die pDZ effektiv zur IL-6 Produktion anregten und zudem große Veränderungen in der Expression von Oberflächenmolekülen bewirkten (Abb. 3.3).

Somit wurde deutlich, dass die FL-BM generierten pDZ bei der Stimulation mit den verschiedenen TLR-Liganden nur durch CpG-ODN, den Liganden für TLR9, zur IFN- $\alpha$  Produktion angeregt werden können und dass es selbst dabei qualitative Unterschiede gibt, welches CpG-ODN verwendet wird. Zusätzlich wurde klar, dass die Stimulierung mit einer

Substanz, die phänotypisch zur Reifung der pDZ führt, nicht zwingend auch die Produktion von IFN- $\alpha$  zur Folge haben muss.

Welche strukturelle Komponente der beiden CpG-ODN für diese unterschiedliche Immunreaktion verantwortlich ist, wurde im Folgenden näher untersucht.

### 3.2. Stimulationen der FL-BM DZ mit CpG-2216, CpG-1668 und R-848

#### 3.2.1 Reifung und Zytokinproduktion durch CpG-ODN Stimulation sind TLR9 abhängig

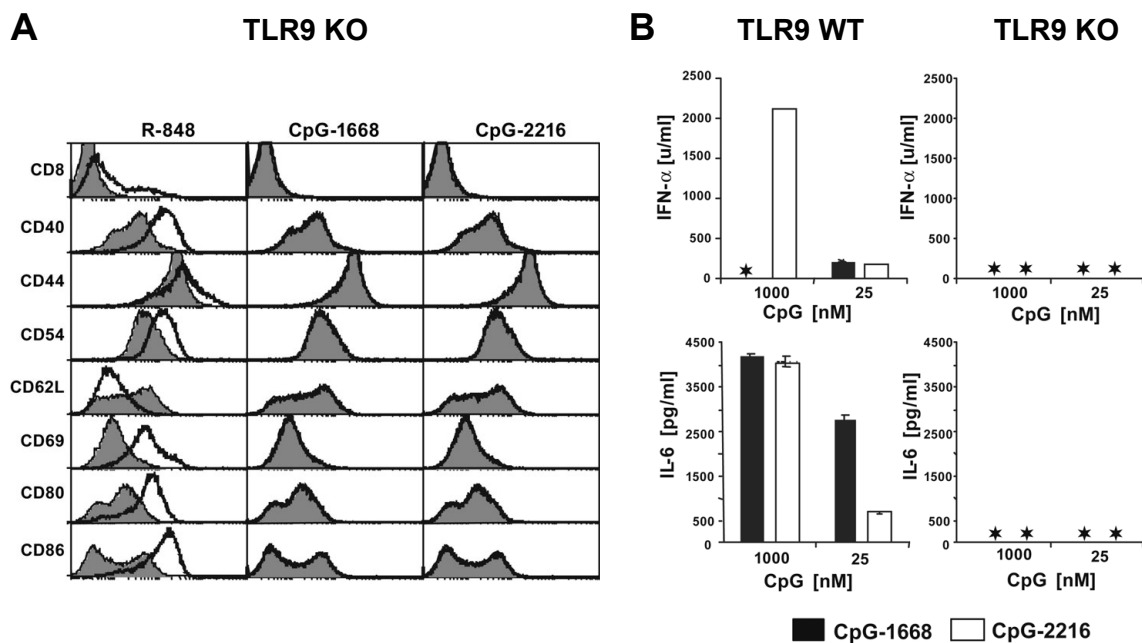
In der Literatur wurden zwei verschiedene Typen von CpG-DNA Oligonukleotiden (ODN) beschrieben, welche unterschiedliche biologische Reaktionen in humanen Immunzellen hervorrufen [Verthelyi, 2001; Krug, 2001]. Typ B CpG-ODN induzieren die Proliferation von B-Zellen und die Reifung von DZ. Jedoch induzieren sie in hohen Konzentrationen nur sehr geringe Mengen an IFN- $\alpha$ . Dieser Typ CpG-ODN enthält nur ein CpG-Motif und das Rückgrat des Oligonukleotids ist komplett als Phosphothioat modifiziert. In dieser Arbeit wurde als Vertreter des B-Typs das CpG-ODN 1668 verwendet (siehe Tab. 3.1).

Im Gegensatz zu den Typ B CpG-ODN bewirken Typ A CpG-ODN nur geringe Effekte auf B-Zellen und induzieren in humanen pDZ nur vergleichsweise geringe Mengen TNF- $\alpha$ , aber stattdessen große Mengen an Typ-I Interferonen [Krug, 2001]. Diese Induktion von Typ-I Interferonen beschränkt sich bei diesem Typ von Oligonukleotid aber nicht auf humane pDZ, sondern wir konnten zeigen, dass ebenso murine pDZ auf diese Sequenzen hin viel IFN- $\alpha$  produzieren. Typ A CpG-ODN enthalten typischerweise zwei oder mehrere CpG-Motive (repetitive Sequenzen) und zusätzlich an beiden Enden repetitive Guanodin-Anhänge. Das gesamte Oligonukleotid hat ein gemischtes Rückgrat, da die CpG-tragende Sequenz aus Phosphodiester-Bindungen besteht, die Guanodin-Anhänge jedoch mit Phosphothioat-Bindungen modifiziert sind. Als typischer Vertreter dieser Art CpG-ODN wurde in dieser Arbeit das CpG-Oligo 2216 verwendet (siehe Tab. 3.1).

Name	Sequenz
CpG-2216:	5'- G*G*G G G A <u>C G</u> A T <u>C G</u> T C*G* G*G*G* G*G
CpG-1668:	5'-T*C*C *A*T*G *A* <u>C*G</u> *T*T*C *C*T*G *A*T*G *C*T

Tab. 3.1: Sequenzen der CpG-ODN 2216 und 1668. Unterstrichen sind die jeweiligen CpG-Motive, \* zeigt eine Phosphothioat-Bindung zwischen den Nukleotiden an.

Die unterschiedliche Fähigkeit von CpG-1668 und CpG-2216 in den FL-generierten pDZ IFN- $\alpha$  zu induzieren (siehe Abb. 3.4) warf die Frage auf, ob CpG-2216 eventuell über einen anderen Rezeptor als TLR9 erkannt wird. Um das zu testen wurden aus Knochenmarkszellen TLR9 defizienter Mäuse FL-BM Zellen generiert und mit beiden Arten CpG-ODN stimuliert. Alle Zellen dieser TLR9 KO Kultur waren nicht in der Lage auf CpG-1668 als auch auf CpG-2216 Aktivierungsmarker wie z.B. CD40 oder kostimulatorische Moleküle wie z.B. CD86 hoch zuregulieren Als Kontrollstimulus wurde R-848 verwendet, der zur erhöhten Expression sämtlicher untersuchter Oberflächenmarker führte (Abb. 3.5 A).



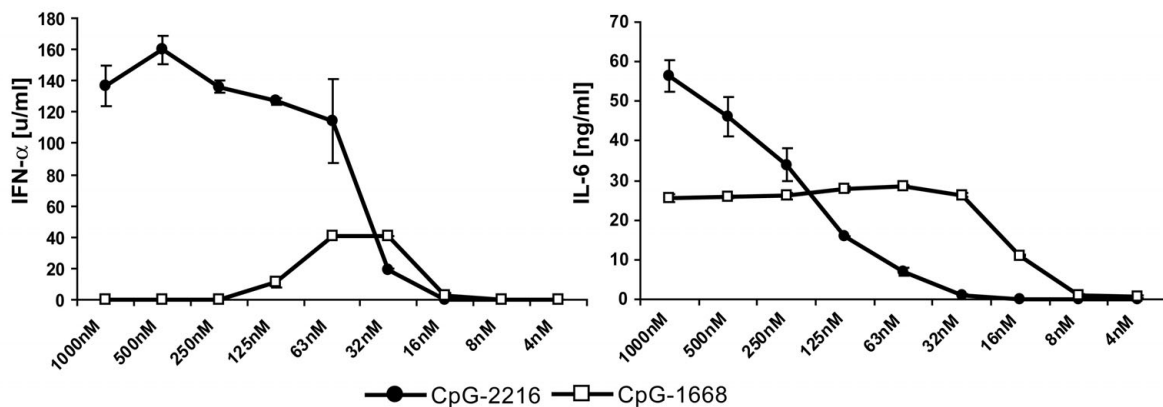
**Abb. 3.5: Reifung der FL-BM DZ (A) und Zytokinproduktion (B) als Reaktion auf Typ A und Typ B CpG-ODN sind abhängig von TLR9.** (A) Flt3-L generierte DZ aus Knochenmark von TLR9 KO Mäusen wurden mit R-848, CpG-1668 oder CpG-2216 stimuliert (schwarze Linie) und die Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern, im Vergleich zu unstimulierten Zellen (graue gefüllte Linie), auf der Zelloberfläche mittels FACS analysiert. Sowohl Typ A CpG, als auch Typ B CpG induziert keine Veränderung der Expression von Oberflächenmarkern in TLR9 KO Zellen. (B) IFN- $\alpha$  und IL-6 ELISA zur Analyse der Zytokinproduktion von TLR9 WT und TLR9 KO FL-BM DZ ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) nach Stimulation mit CpG-1668 (schwarzer Balken) oder CpG-2216 (weißer Balken). Trotz unterschiedlicher Fähigkeit von Typ A und Typ B CpG in den WT-Zellen Zytokine zu induzieren, sind beide CpG-Arten abhängig von TLR9. Sterne weisen auf nicht detektierbare Zytokinmengen hin.

Auch bei der Fähigkeit Zytokine zu induzieren, zeigte sich eine komplette Abhängigkeit von TLR9 für beide CpG-Typen. Weder IFN- $\alpha$  noch IL-6 waren im Kulturüberstand der TLR9 KO FL-BM DZ messbar (Abb. 3.5 B). Zudem zeigte sich bei der Messung der Zytokininduktion erneut der Effekt, dass CpG-1668 bei der hohen Konzentration von 1000 nM auch in den Wildtyp (WT) FL-BM DZ kein IFN- $\alpha$  induziert (s. auch Abb. 3.4), jedoch konnte diesmal eine geringe IFN- $\alpha$  Produktion gemessen werden, wenn eine geringe Konzentration von 25 nM eingesetzt wurde (Abb. 3.5 B).

Diese TLR9 Abhängigkeit beider CpG-Typen wurde inzwischen durch Hemmi *et al.* 2003 bestätigt. So konnte gezeigt werden, dass sowohl für CpG-1668 als auch für CpG-2216 TLR9 essentiell ist, um das Aktivierungs-Signal weiter in die Zelle zu leiten.

### 3.2.2 Effekte der Konzentration von Typ A und Typ B CpG-ODN auf die Zytokinproduktion der FL-BM Zellen

Aufgrund der Zytokin-Daten der TLR9 WT und KO Mäuse (s. Abb. 3.5 B) wurde deutlich, dass CpG-1668 ebenfalls in der Lage ist die Produktion von IFN- $\alpha$  in den FL-BM-DZ zu induzieren. Jedoch war noch nicht geklärt, in wie weit dieses Phänomen tatsächlich von der eingesetzten CpG-Konzentration abhängig war und wie viel IFN- $\alpha$  die Zellen in der Lage sind auf diesen Typ CpG zu produzieren. Um dies zu testen wurden die Gesamtzellen einer FL-BM Kultur mit einer abfallenden Konzentrationsreihe von CpG-2216 oder CpG-1668 für mindestens 18 h stimuliert und anschließend IFN- $\alpha$  und IL-6 mittels ELISA gemessen. Es zeigte sich, dass die Kulturzellen bei einer hohen Konzentration von CpG-2216 viel IFN- $\alpha$  produzierten und dass diese Induktion mit fallender CpG-Konzentration abnahm. Dieselbe konzentrationsabhängige Produktion zeigte sich auch für IL-6 (siehe Abb. 3.6).



**Abb. 3.6: Unterschiedliche Induktion von IFN- $\alpha$  und IL-6 durch CpG-ODN 2216 (Typ A) und 1668 (Typ B).** ELISA zur Analyse der IFN- $\alpha$  und IL-6 Produktion FL-BM DZ ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml) nach der Stimulation mit einer abfallenden Konzentrationsreihe von CpG-2216 (schwarze Punkte) oder CpG-1668 (weiße Punkte).

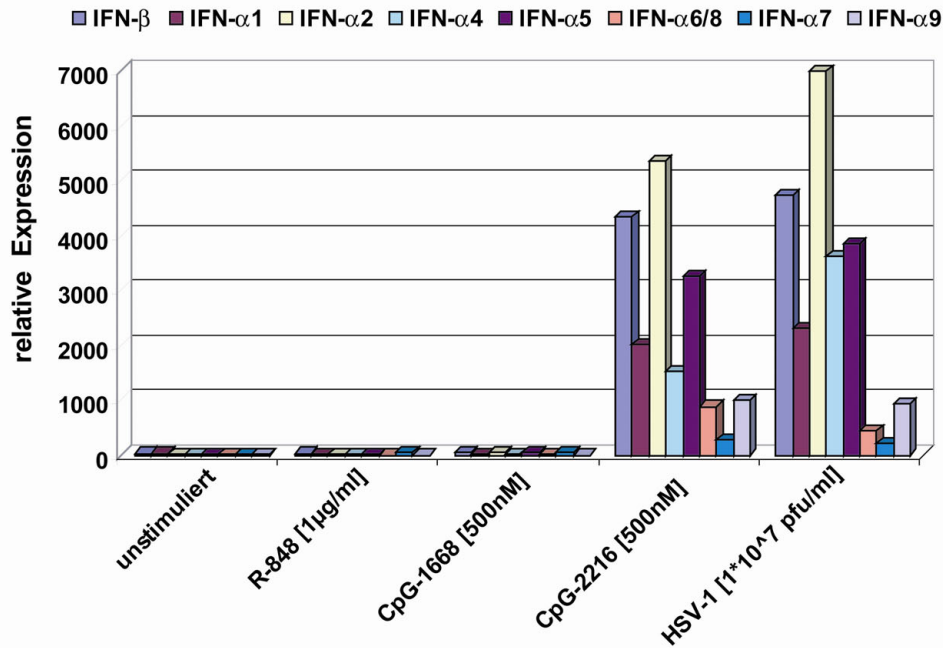
Für die Induktion von IFN- $\alpha$  durch CpG-1668, ergab sich ebenfalls das bereits beschriebene Bild, dass nur bei niedrigen Konzentrationen von 125 nM - 30 nM eine geringe IFN- $\alpha$  Induktion gemessen werden konnte. Bei IL-6 zeigte sich bis zur Konzentration von 32 nM an CpG-1668 eine konstante Produktion des Zytokins.

### **3.2.3 Unterschiedliche Expression der mRNA der Typ-I IFN Gene nach Stimulation mit CpG-1668, CpG-2216, HSV-1 und R-848**

Um den Mechanismus hinter dem unterschiedlichen IFN- $\alpha$  Induktionen durch A-Typ oder B-Typ CpG-ODN besser zu verstehen, wurde die Expression der mRNA für die verschiedenen IFN- $\alpha$  Moleküle und dem einzigen IFN- $\beta$  Molekül analysiert. Dazu wurden mindestens 3 unterschiedliche FL-BM Kulturen nach 8 Tagen Kultur mit einem Zellsortierer in pDZ und cDZ getrennt und diese anschließend für 8 h mit CpG-1668 [500nM], CpG-2216 [500nM], R-848 [1 $\mu$ g/ml] und HSV-1 [1x10<sup>7</sup>pfu/ml] stimuliert. Zusätzlich wurde immer eine unstimulierte Kontrolle mit angesetzt. Aus den stimulierten bzw. unstimulierten Zellen wurde im Anschluss die Gesamt-RNA isoliert und die jeweiligen gleichen Experimente gepoolt. Durch das Poolen der RNA verschiedener Kulturen wurden so die kulturbedingten Schwankungen in der mRNA Expression ausgeglichen. Die isolierte RNA wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Roland Lang (TU-München) dort markiert, auf einen Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> hybridisiert und ausgewertet.

Es zeigte sich, dass alle annotierten Typ-I Interferone bei den Stimulationen mit CpG-2216 und HSV-1 induziert wurden. Im Gegensatz dazu, wurden durch die Stimuli CpG-1668 und R-848 nach 8 h so gut wie keine mRNA für die Typ-I Interferone induziert. (Abb. 3.7). Somit wurde deutlich, dass die Ursache für nicht detektierbares IFN- $\alpha$  (wie auf Proteinebene durch ELISA bestimmt worden war) auf der Transkriptionsebene zu suchen war. Damit wurden posttranskriptionelle Mechanismen (z.B. Unterschiede in der Sekretion von IFN- $\alpha$ ) unwahrscheinlich.



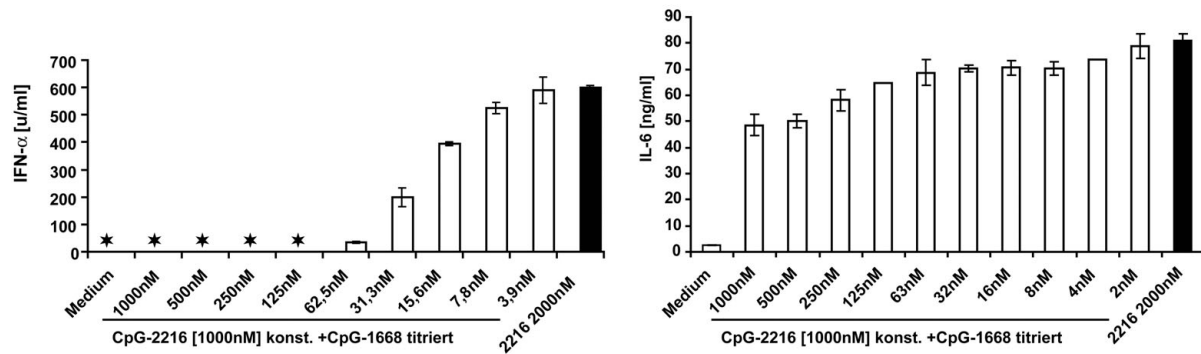


**Abb.3.7: Relative Expression der mRNA für die bekannten Typ-I IFN Gene von pDZ nach 8 h Stimulation mit dem jeweils auf der X-Achse angegebenen Stimulus.**

### 3.2.4 Inhibition der IFN-α Produktion der FL-BM DZ durch CpG-1668 und R-848

Um zu testen, ob diese fehlende Expression der IFN-α Gene bei einer Stimulation mit CpG-1668 und R-848 auch Auswirkungen auf die IFN-α Produktion bei einer Stimulation mit CpG-2216 hat, wurden FL-BM DZ zeitgleich mit CpG-2216 [1000 nM] und CpG-1668 [1000 nM] stimuliert. Nach Analyse der Kulturüberstände mittels ELISA zeigte sich, dass die erwartete Produktion von IFN-α, aufgrund der Stimulation mit CpG-2216, nicht mehr messbar war. Ein indirekter Toxizitätseffekt, oder Tod der Zellen konnte ausgeschlossen werden, da die IL-6 Produktion durch diese simultane Stimulation nicht beeinträchtigt war. Um aufzuklären, in wie weit diese Repression der IFN-α Produktion konzentrationsabhängig war, wurden die FL-BM DZ mit einer konstanten Konzentration von CpG-2216 [1000 nM] zusammen mit einer absteigenden Konzentrationsreihe von CpG-1668 stimuliert. Bei der Titration zeigte sich, dass bei hohen Konzentrationen von CpG-1668 kein IFN-α im Kulturüberstand nachweisbar war. Diese IFN-α-Inhibierung durch CpG-1668 lag noch bei einer bis zu achtfach höheren Konzentration von CpG-2216 im Vergleich zu CpG-1668 vor. Erst ab einer geringen Konzentration von CpG-1668 [~63 nM], der Konzentrationsbereich in dem CpG-1668 selbst IFN-α induziert, nahm die Inhibierung ab und die FL-BM DZ konnten maximal IFN-α produzieren. Das inhibitorische Phänomen war spezifisch für IFN-α, da andere DZ Metabolite, wie z.B. IL-6, durch eine simultane Stimulierung mit den beiden CpG-Typen nicht beeinträchtigt waren (Abb. 3.8).

Da sowohl CpG-1668 als auch CpG-2216 von TLR9 erkannt werden, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der beobachteten Inhibition der IFN- $\alpha$  Produktion nicht doch um eine Konkurrenz um den gleichen Rezeptor handelt, und dass CpG-1668, entgegen der allgemeinen Annahme, besser von TLR9 erkannt wird als CpG-2216.

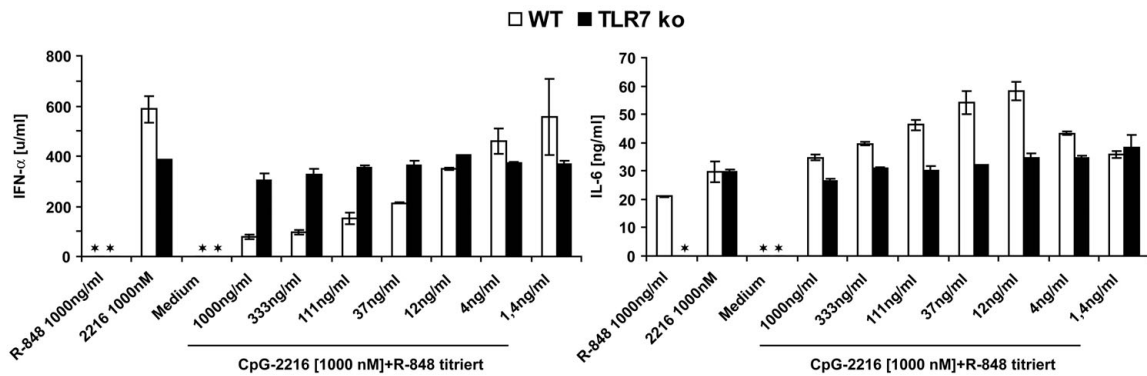


**Abb. 3.8: Inhibition der IFN- $\alpha$  Produktion von CpG-2216 durch gleichzeitige Stimulation mit CpG-1668.** FL-BM DZ ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden mit einer konstanten Konzentration an CpG-2216 (1000 nM) und simultan mit einer absteigenden Konzentration von CpG-1668 (1000 nM-3,9 nM) stimuliert. Sterne zeigen nicht detektierbare Zytokinmengen.

Wie schon beschrieben, induzierte der TLR7 Ligand R-848 bei den FL-BM DZ ebenfalls keine Produktion von IFN- $\alpha$  (s. Abb. 3.4), war jedoch, wie CpG-1668, ebenfalls in der Lage die Zellen optimal zu stimulieren (s. Abb. 3.2). Da auch bei den Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Experimenten keine Expression der Typ-I-IFN Gene gemessen werden konnte (s. Abb. 3.7), lag die Vermutung nahe, dass R-848 ebenfalls inhibitorisch auf die Produktion von IFN- $\alpha$  wirkt. Um dies zu testen, wurden FL-DZ aus Wildtyp-Mäusen und TLR7 KO Mäusen gleichzeitig mit CpG-2216 und dem TLR7 Liganden R-848 stimuliert.

Bei diesem Experiment zeigte sich, dass bei den DZ aus den Wildtyp-Mäusen die Produktion von IFN- $\alpha$  durch CpG-2216 konzentrationsabhängig von R-848 unterdrückt wurde. Diese Inhibition war zudem TLR7 abhängig, da in den FL-DZ von TLR7 defizienten Mäusen keine Beeinträchtigung der IFN- $\alpha$  Produktion beobachtet werden konnte. Auch bei diesem Experiment wurde die IL-6 Produktion durch die gleichzeitige Stimulation mit R-848 nicht inhibiert (Ab. 3.9).

Da R-848 über TLR7 und CpG-2216 über TLR9 das Stimulationssignal in die Zelle weiterleiten, und außerdem beide Substanzen vermutlich über unterschiedliche Rezeptoren aufgenommen werden, lässt sich in diesem Falle eine gegenseitige Rivalität um den gleichen Aufnahmerezeptor oder die entsprechenden TLR ausschließen.



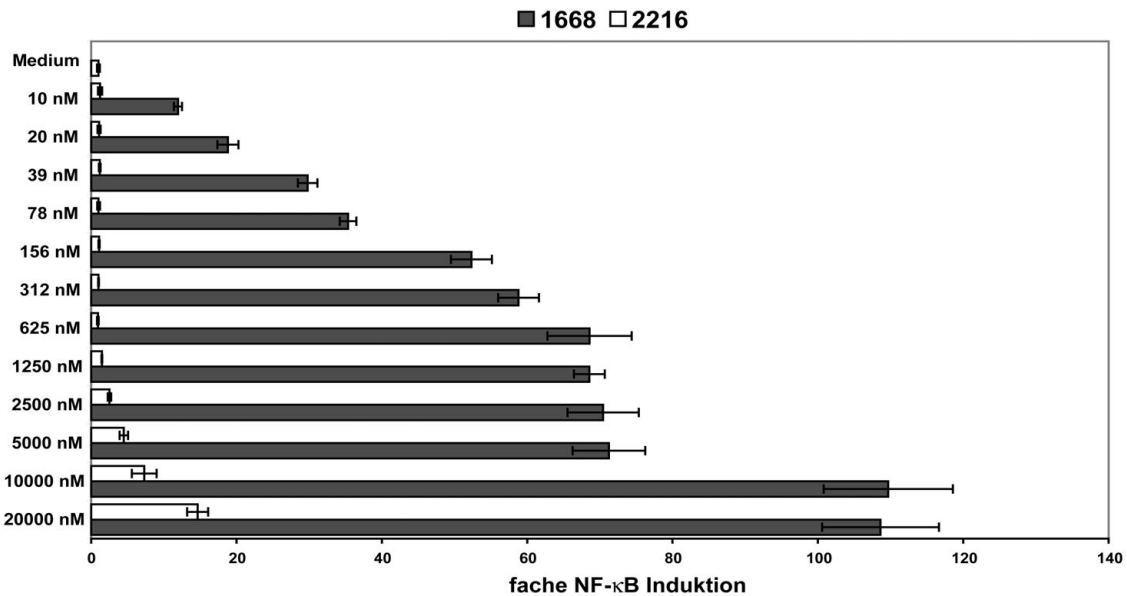
**Abb. 3.9: Inhibition der IFN- $\alpha$  Produktion von CpG-2216 durch gleichzeitige Stimulation mit R-848.** FL-BM DZ aus TLR7 WT (weiße Balken) und TLR7 KO Mäusen (schwarze Balken) ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden mit einer konstanten Konzentration an CpG-2216 (1000 nM) und simultan mit einer absteigenden Konzentration von R-848 stimuliert. Sterne geben nicht detektierbare Mengen an Zytokinen an.

### 3.2.5 Unterschiedliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B

Da bekannt war, dass bei der IFN- $\alpha$  Regulation auch der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B eine Rolle spielt (s. 1.4; Abb. 1.3), wurde im nächsten Schritt getestet, ob die beiden CpG-Typen nach Stimulation unterschiedlich NF- $\kappa$ B induzieren. Zu diesem Zweck wurden uns freundlicherweise von PD Dr. Stefan Bauer HEK293 Zellen zur Verfügung gestellt, die stabil mit murinem TLR9 und einem NF- $\kappa$ B-Promotor-Luziferase-Vektor transfiziert waren. Mit Hilfe dieser Zellen war es möglich nach der Stimulation mit CpG-DNA die Aktivierung von NF- $\kappa$ B aufgrund der zusätzlich gebildeten Luziferase zu messen (s. 2.6).

Es zeigte sich, dass CpG-1668 schon in sehr niedrigen Konzentrationen von 10-80 nM eine starke NF- $\kappa$ B Induktion zeigte, wohingegen eine leichte NF- $\kappa$ B Aktivierung durch CpG-2216 erst bei sehr hohen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.10).

Da auch R-848 eine starke Aktivierung von NF- $\kappa$ B aufweist [Jurk, 2002] wuchs die Vermutung, dass die hohe Aktivierung des Transkriptionsfaktors direkt mit der Inhibierung der IFN- $\alpha$  Produktion zusammenhängt.



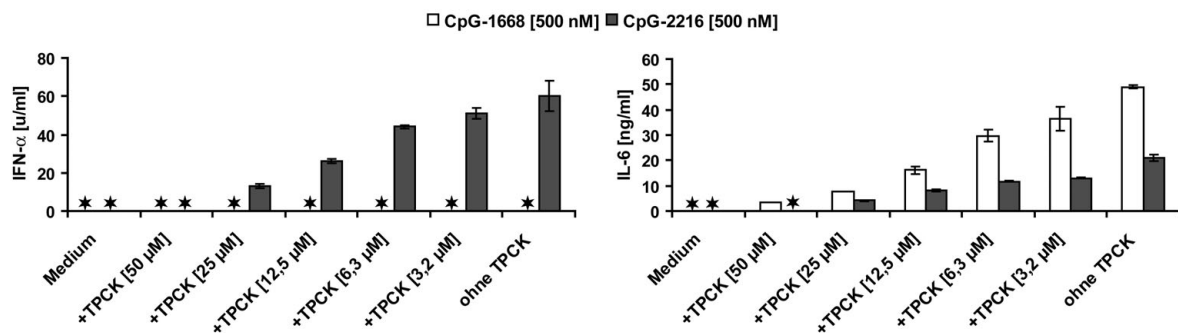
**Abb. 3.10: Luziferase Assay zur Bestimmung der NF-κB Aktivierung von CpG-1668 und CpG-2216.** Mit mTLR9 und NF-κB-Reporterplasmid stabil transizierte HEK293 Zellen ( $1 \times 10^5$  Zellen/ml) wurden für 7 h mit CpG-1668 (grau) oder CpG-2216 (weiß) stimuliert und anschließend die NF-κB Induktion gemessen.

### 3.2.6 Versuch zur Inhibierung der NF-κB Aktivierung durch TPCK

Um zu testen, ob eine hohe Menge an aktivierten Transkriptionsfaktor NF-κB tatsächlich die Produktion von IFN-α hemmt, wurde ein Inhibitor für NF-κB: TPCK (*Tosyl-L-phenylalanylchloromethan*), zusammen mit CpG-2216 [500 nM] oder CpG-1668 [500 nM] zu den FL-BM DZ gegeben. Ziel war es eine TPCK-Konzentration zu finden, die die Menge an aktivierten NF-κB nach der Stimulation mit CpG-1668 so weit senkt, dass sie der Menge entspricht, die bei der Stimulation mit CpG-2216 auftritt. Falls eine geringe Quantität des aktivierten NF-κB direkt mit der IFN-α Induktion korreliert, müsste das die Produktion von IFN-α zur Folge haben.

Es zeigte sich, dass bei einer TPCK-Konzentration von 50 μM weder von CpG-2216 noch von CpG-1668 Zytokine produziert wurden. Dies lag aber an einem massiven Zelltod aufgrund der Zytotoxizität des TPCKs. Ab einer Konzentration von 25 μM des Inhibitors konnte die Produktion von IFN-α als Antwort auf CpG-2216 wieder gemessen werden, wenn auch geringer als bei der Stimulation ohne TPCK. Die volle Induktion der IFN-α Produktion war ab einer TPCK Konzentration von 6,3 μM wieder zu beobachten. Auch die Bildung des NF-κB abhängigen Zytokins IL-6 wurde durch TPCK beeinträchtigt. Aber auch hier konnte ab einer TPCK-Konzentration von 6,3 μM sowohl bei der Stimulation mit CpG-2216 als auch mit CpG-1668 eine robuste Induktion des Zytokins gemessen werden. Die niedrigeren IL-6 Werte bei 6,3 μM TPCK, im Vergleich mit den ohne TPCK stimulierten Zellen, lassen sich

wahrscheinlich auf den inhibitorischen Effekt der Chemikalie zurückführen und nicht auf Zelltod, da bei dieser Konzentration die IFN- $\alpha$  Produktion mit CpG-2216 nahe an den Wert ursprünglichen Wert ohne TPCK hinreicht. Die verringerte NF- $\kappa$ B Menge bei der Stimulation mit 6,3  $\mu$ M TPCK war somit ausreichend um IFN- $\alpha$  als Antwort auf CpG-2216 zu induzieren. Eine IFN- $\alpha$  Produktion aufgrund der Stimulation mit CpG-1668 konnte jedoch bei keiner der eingesetzten Konzentration an TPCK gemessen werden (Abb. 3.11)



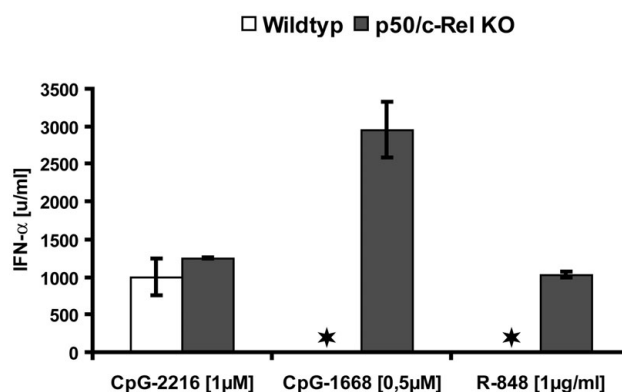
**Abb. 3.11: ELISA nach der Stimulation von FL-BM DZ ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) für 21 h mit CpG-1668 [500 nM] oder CpG-2216 [500 nM] mit und ohne NF- $\kappa$ B Inhibitor TPCK. Selbst durch die Inhibition von NF- $\kappa$ B konnte keine IFN- $\alpha$  Produktion als Reaktion auf CpG-1668 gemessen werden. Sterne zeigen nicht detektierbare Mengen des Zytokins an.**

Auch andere Inhibitoren des Aktivierungsweges von NF- $\kappa$ B, wie z.B. BAY 11-7082, führten zu keiner IFN- $\alpha$  Produktion als Reaktion auf eine Stimulation mit CpG-1668 in hoher Konzentration. Lediglich Wortmannin, ein Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinase (Pi3K), führte mit CpG-1668 zu einer IFN- $\alpha$  Produktion. Die erzielte Menge war aber nur mit der zu vergleichen, welche mit niedriger CpG-1668-Konzentration produziert wurde. Da bekannt war, dass Wortmannin zudem die Aufnahme von CpG-DNA in Zellen hemmt [Ishii, 2002] wurde durch Dr. Frank Schmitz (TU-München) mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie bestätigt, dass durch Wortmannin lediglich weniger CpG-1668 in die Zelle gelangt und diese geringe Menge für die beobachtete IFN- $\alpha$  Produktion verantwortlich ist.

### 3.2.7 p50 defiziente Mäuse reagieren auf hohe Konzentrationen von CpG-1668 mit der Produktion von IFN- $\alpha$

Da die Inhibition von NF- $\kappa$ B durch chemische Inhibitoren zu keinem Ergebnis führte, wurden im Zuge einer Kooperation mit Dr. Meredith O’Keeffe und Dr. Steve Gerondakis am WEHI in Melbourne, Australien verschiedene NF- $\kappa$ B defiziente Mäuse auf das Inhibitionsphänomen durch CpG-1668 oder R-848 hin untersucht. Zu der Familie der Rel/NF- $\kappa$ B Proteine, von

denen insgesamt fünf bekannt sind, gehören: p50 (=NF- $\kappa$ B1), p52 (=NF- $\kappa$ B2), p65 (=RelA), RelB, and c-Rel. Allen gemeinsam sind eine DNA-Bindestelle und eine Dimerisierungsstelle durch die sie als Homo oder Hetero-Dimer den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B bilden. Im Einzelnen wurden FL-BM DZ und *ex vivo* isolierte pDZ von folgenden NF- $\kappa$ B KO Mäusen getestet: RelA, RelB, c-rel, NF- $\kappa$ B1 (=p50), NF- $\kappa$ B2 (=p52) und Doppel KO (p50/c-rel). Die Zellen wurden als Gesamt-FL-BM DZ oder nach Sortierung mit CpG-2216 [1  $\mu$ M], CpG-1668 [0,5  $\mu$ M] oder R-848 [1  $\mu$ g/ml] stimuliert. Nach 46 h wurde der Kulturüberstand abgenommen und mittels ELISA die IFN- $\alpha$  Produktion gemessen. Es zeigte sich, dass Zellen aus KO Mäusen ohne NF- $\kappa$ B1 (mit oder ohne Beteiligung von c-rel) auch auf CpG-1668 oder R-848 hohe Konzentrationen von IFN- $\alpha$  produzieren konnten. Damit zeigte sich die Inhibition der IFN- $\alpha$  Produktion durch CpG-1668 oder R-848 abhängig von NF- $\kappa$ B1 (p50), aber nicht von den anderen NF- $\kappa$ B Subtypen (RelA, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B2). Exemplarisch sind in Abb. 3.12 die Daten für die reine pDZ Population aus p50/c-Rel KO Mäusen dargestellt. Es wurde deutlich, dass die Zellen der *knock-out* Mäuse in der Lage waren sowohl auf CpG-1668 als auch auf R-848 eine große Menge an IFN- $\alpha$  zu produzieren. Bei R-848 lag die Menge im Bereich der CpG-2216 Stimulation, bei CpG-1668 ging sie sogar darüber hinaus. Die Wildtypzellen reagierten erwartungsgemäß nur auf CpG-2216 mit der Produktion von IFN- $\alpha$ .



**Abb. 3.12: IFN- $\alpha$  Produktion von p50 / c-Rel KO pDZ ( $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml) auf Stimulation mit CpG-2216, CpG-1668 und R-848.** Sowohl auf CpG-1668 als auch auf R-848 produzieren die Zellen große Mengen an IFN- $\alpha$ . Sterne zeigen nicht detektierbare Mengen des Zytokins.

Dieses Ergebnis macht deutlich, dass das inhibitorische Phänomen bei der IFN- $\alpha$  Produktion von pDZ durch CpG-1668 oder R-848 von NF- $\kappa$ B1 abhängig ist. Welche weiteren Moleküle für diese Inhibition eine Rolle spielen ist Gegenstand der gegenwärtigen Forschung.

Ein anderer Ansatz zur Identifizierung der Unterschiede zwischen A-Typ und B-Typ CpG-ODN waren Analysen zur chemischen Zusammensetzung der ODN, welche in den folgenden Kapiteln dargestellt werden.

### 3.3. Welche chemische Komponente der CpG-ODN ist für die unterschiedliche IFN- $\alpha$ Induktion verantwortlich?

Da sich Typ A und Typ B CpG-ODN in ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheiden, war es ein weiteres Ziel, die Komponente zu identifizieren, welche für die unterschiedliche IFN- $\alpha$  Induktion verantwortlich ist. Es wurde angenommen, dass das gemischte Rückgrat mit den Guanodin-Anhängen am 5' und 3' Ende, im Zusammenhang mit der zentralen Sequenz mit den repetitiven CpG-Motifen, der Typ A CpG-ODN für die große IFN- $\alpha$  Produktion verantwortlich ist. Um herauszufinden welcher dieser Bestandteile letztlich für die IFN- $\alpha$  Induktion nötig ist, wurden diverse Modifikationen in den Ursprungssequenzen eingefügt. Zuerst konzentrierten sich die Untersuchungen auf den Einfluss der Kernsequenz für die IFN- $\alpha$  Induktion.

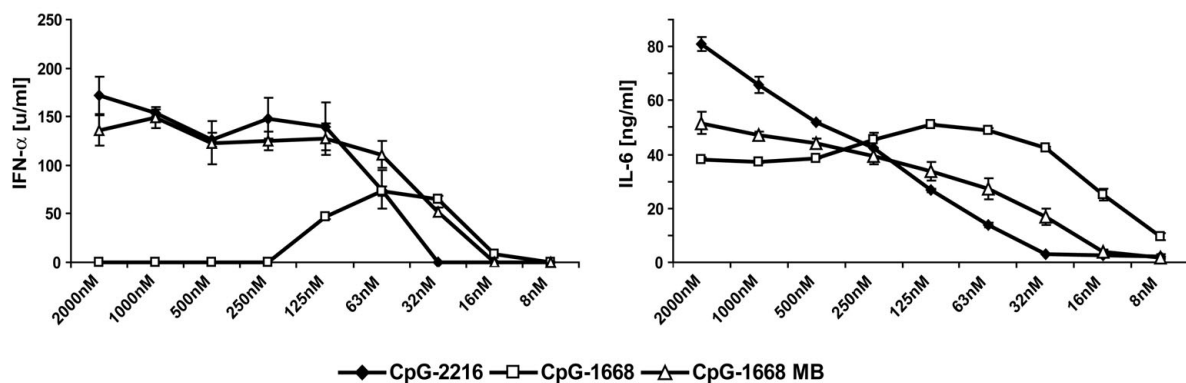
#### 3.3.1 Einfluss der CpG-Kernsequenz

Um herauszufinden, welchen Einfluß die innere Kernsequenz der CpG-ODN auf die IFN- $\alpha$  Induktion hat, wurde das CpG-ODN 1668 chemisch so modifiziert, dass es bis auf die innere Sequenz dem CpG-ODN 2216 glich. D. h. es wurden an die ursprüngliche Sequenz von CpG-1668 an beiden Enden poly-G-Anhänge angefügt, die durch Phosphothioat-Bindungen stabilisiert wurden, während das Rückgrat der inneren CpG-haltigen Sequenz aus Phosphodieser-Bindungen bestand. Damit entstand ein so genanntes „mixed backbone“ (MB), wie es auch die Originalsequenz von CpG-2216 aufweist. Die genauen Sequenzen und Modifikationen können aus Tabelle 3.2 entnommen werden.

Name	Sequenz
CpG-1668:	5'- T*C*C*A*T*G*A* <u>C*G</u> *T*T*C*C*T*G*A*T*G*C*T
CpG1668-MB:	5'- G*G*T C C A T G A <u>C G</u> T T C C T G A T G C T G*G*G*G*G
CpG-2216:	5'- G*G*G G G A <u>C G</u> A T <u>C G</u> T C*G*G*G*G*G

Tab. 3.2: Sequenzen der CpG-ODN 2216, 1668 und 1668-MB. Unterstrichen sind die jeweiligen CpG-Motife, \* zeigt eine Phosphothioat-Bindung zwischen den Nukleotiden an.

FL-BM generierte Kulturzellen wurden mit einer abfallenden Konzentrationsreihe mit diesen CpG-ODN für mindestens 18 h stimuliert und sowohl die IFN- $\alpha$  als auch die IL-6 Produktion mittels ELISA gemessen. Überraschender Weise wurde deutlich, dass das so modifizierte CpG-ODN 1668 ebenfalls in der Lage war in hohen Konzentrationen die Produktion von großen Mengen an IFN- $\alpha$  zu induzieren. (Abb. 3.13). Es war kaum ein Unterschied zwischen dem klassischen Typ A CpG-ODN 2216 und dem modifizierten Typ B CpG-ODN 1668 erkennbar. Somit wurde deutlich, dass die innere Kernsequenz der CpG-ODN 1668 und 2216 nicht von entscheidender Bedeutung für die IFN- $\alpha$  Induktion ist, sondern, dass die ausschlaggebende Komponente entweder die Bindungen des Rückgrats, oder die poly-G Anhänge an den 3' und 5' Enden sein müssen.



**Abb. 3.13: Einfluss der CpG-Kernsequenz auf die Produktion von IFN- $\alpha$  und IL-6.** Stimulation der FL-BM DZ ( $1,75 \times 10^6$  Zellen/ml) mit CpG-2216, CpG-1668 oder CpG-1668 MB. Analyse der IFN- $\alpha$  und IL-6 Produktion mittels ELISA.

### 3.3.2 Einfluss der Phosphothioat-Bindungen des Rückgrats

Da gezeigt werden konnte, dass die innere Kernsequenz nicht die ausschlaggebende Komponente für die Zytokinproduktion ist (Abb. 3.13), wurde sowohl bei Typ A (CpG-2216) als auch bei Typ B (CpG-1668) die Bindung zwischen ihren Nukleotiden verändert, nicht aber die Sequenz. Das heißt, dass das gemischte Rückgrat des ursprünglichen CpG-2216 entweder durch ein komplettes Phosphodiester (PD) oder komplettes Phosphothioat (PTO) Rückgrat ersetzt wurde. Das ursprüngliche CpG-ODN 1668 lag bereits mit einem Phosphothioat-Rückgrat vor, das durch Phosphodiester-Bindungen ersetzt wurde. Die genauen Sequenzen können aus der Tabelle 3.3 entnommen werden.

FL-BM Kulturzellen wurden mit abfallenden Konzentrationsreihen der so modifizierten CpG-ODN stimuliert und die Zytokinproduktion mittels ELISA gemessen.



Name	Sequenz
CpG-2216:	5'- G*G*G G G A <u>C G A T C G T</u> C*G*G*G*G*G
CpG-2216 PD:	5'- G G G G G A <u>C G A T C G T</u> C G G G G G G
CpG-2216 PTO:	5'- G*G*G*G*G*A* <u>C*G*A*T*C*G</u> *T*C*G*G*G*G*G
CpG-1668:	5'- T*C*C*A*T*G*A* <u>C*G</u> *T*T*C*C*T*G*A*T*G*C*T
CpG-1668 PD:	5'- T C C A T G A <u>C G T T C C T G A T G C T</u>

Tab. 3.3: Sequenzen der CpG-ODN 2216, 2216-PD, 2216-PTO, 1668 und 1668-MB. Unterstrichen sind die jeweiligen CpG-Motife, \* zeigt eine Phosphothioat-Bindung zwischen den Nucleotiden an.

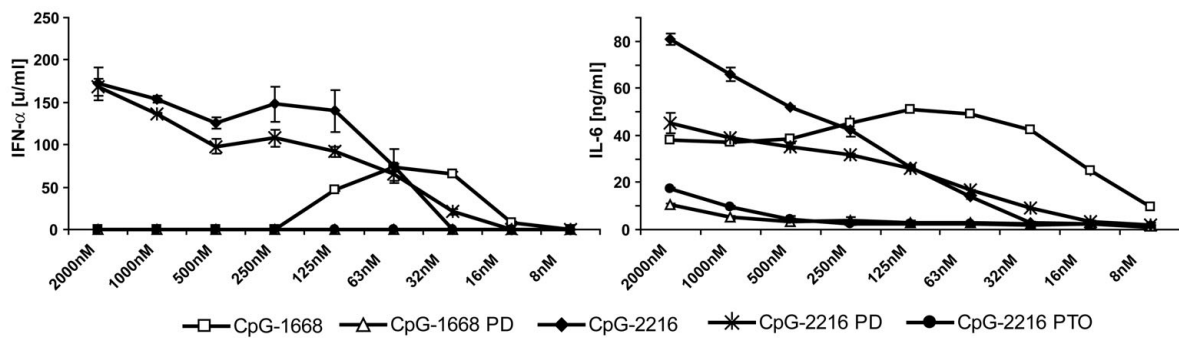
Für die konzentrationsabhängige IFN- $\alpha$  Produktion von CpG-2216 war es unerheblich, ob die poly-G-Anhänge ein Phosphodiester- oder Phosphothioat Rückgrat besaßen, da beide Varianten annähernd gleich große Kapazität besaßen IFN- $\alpha$  zu induzieren (~200 u/ml) (Abb. 3.14). Nur wenn zusätzlich zu den poly-G-Anhängen auch die Kernsequenz durch Phosphothioat Bindungen stabilisiert wurde (2216-PTO), war keinerlei IFN- $\alpha$  mehr messbar. Ein vergleichbares Bild zeigte sich auch bei der Produktion von IL-6 als Antwort auf diese CpG-2216 Varianten. Somit scheint die Kombination von poly-G mit kompletter Phosphothioat Modifikation zur weit reichenden biologischen Inaktivierung der ODN zu führen.

Das CpG-2216 mit einem vollständigen Phosphodiester-Rückgrat (CpG-2216 PD) war zwar auch in der Lage konzentrationsabhängig die IL-6 Produktion anzuregen, die maximale Produktion von ~45ng/ml bei der Stimulation mit 2 $\mu$ M CpG-ODN lag jedoch nur etwa bei der Hälfte als die, die mit dem unmodifizierten CpG-2216, mit dem „mixed backbone“, erreicht werden konnte. Allerdings ließ sich bei dieser kompletten PD-Modifikation auch noch bei 16 nM CpG-ODN IL-6 nachweisen (~3,5ng/ml), wo hingegen bei dieser Konzentration mit dem ursprünglichen CpG-2216 bereits kein IL-6 mehr gemessen werden konnte. Als Kontrast dazu induzierte das CpG-2216 PTO nur in den höchsten Konzentrationen von 2 $\mu$ M und 1 $\mu$ M geringe Mengen IL-6 (Abb. 3.10).

Bei den CpG-1668 Sequenzen ging durch das komplette Phosphodiester Rückgrat (CpG-1668 PD) neben der Fähigkeit in geringen Konzentrationen IFN- $\alpha$  zu induzieren, auch die hohe Induktion von IL-6 verloren. IL-6 konnte lediglich in geringen Mengen in den höchsten Konzentrationen nachgewiesen werden. Der Grund für die mangelnde Zytokinproduktion des CpG-1668 PD liegt wohl darin, dass es weder schützende poly-G-Anhänge an den Enden trägt, noch durch Phosphothioat-Bindungen stabilisiert wird. Somit wird das komplette CpG-1668 PD zu anfällig für den Abbau durch DNasen, die von den zu stimulierenden Zellen gebildet werden. Dieser Verdau des Oligonucleotids geschieht noch bevor es zu einem

ausreichenden Aktivierungssignal in den Zellen kommt, welches zur Produktion der Zytokine führen würde (Abb. 3.14).

Letztlich konnte so aber gezeigt werden, dass große Mengen an IFN- $\alpha$  als Antwort auf CpG-2216 auch produziert werden, wenn die poly-G-Anhänge nicht durch Phosphothioat stabilisiert wurden. Die IFN- $\alpha$  induzierende Komponente stellt somit nicht das gemischte Rückgrat aus PD und PTO dar.



**Abb. 3.14: Einfluss der Phosphothioat-Bindungen auf die Produktion von IFN- $\alpha$  und IL-6.** Stimulation der FL-BM DZ ( $1,75 \times 10^6$  Zellen/ml) mit CpG-1668, CpG-1668 PD, CpG-2216, CpG-2216 PD oder CpG-2216 PTO. Analyse der IFN- $\alpha$  und IL-6 Produktion mittels ELISA.

### 3.3.3 Einfluss der Guanosin-Anhänge von CpG-2216

Als letzte Modifikationsmöglichkeit wurde der Einfluss der Guanosin-Anhänge an der ursprünglichen CpG-2216 Sequenz untersucht. Dafür wurden CpG-Oligonukleotide entworfen, deren Sequenz jener von CpG-2216 entsprach, deren Nukleotidbindungen komplett aus Phosphodiester bestanden und denen entweder am 5' oder am 3' Ende die Guanosinkette fehlte. Die genauen Sequenzen sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Name	Sequenz
CpG-2216:	5'- G*G*G G G A <u>C G A T C G T</u> C*G*G*G*G*G*G
CpG-2216 PD:	5'- G G G G G A <u>C G A T C G T</u> C G G G G G G
CpG-2216 5`G-del:	5'- A <u>C G A T C G T</u> C G G G G G G
CpG-2216 3`G-del:	5'- G G G G G A <u>C G A T C G T</u> C

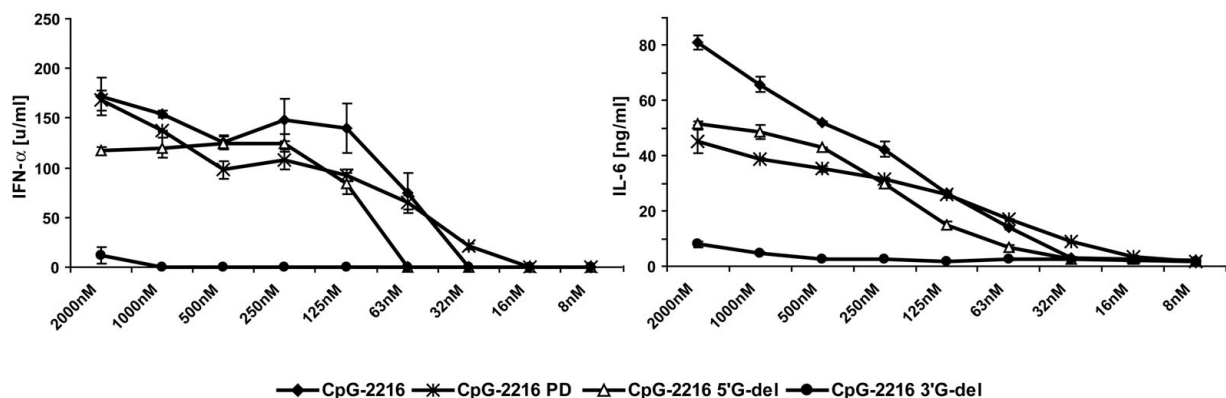
**Tab. 3.4: Sequenzen der CpG-ODN 2216, 2216-PD, 2216 5`G-del und 2216 3`G-del.** Unterstrichen sind die jeweiligen CpG-Motive, \* zeigt eine Phosphothioat-Bindung zwischen den Nukleotiden an.

Erneut wurden FL-BM Kultur DZ mit diesen unterschiedlichen Oligonukleotiden für mind. 18 h bei 37 °C stimuliert und der Kulturüberstand mittels ELISA auf IFN- $\alpha$  und IL-6 untersucht.

Wie schon in Kapitel 3.3.2 beschrieben zeigten sich kaum Unterschiede in der Induktion beider Zytokine, wenn statt dem ursprünglichen CpG-2216 ein CpG-2216 PD verwendet wurde, dessen Rückgrat vollständig aus Phosphodiester-Bindungen bestand. Zusätzlich war das Oligonukleotid in der Lage große Mengen an IFN- $\alpha$  und IL-6 in den *in vitro* generierten Dendritischen Zellen zu induzieren, selbst wenn der 5'-Guanosin Anhang (CpG-2216 5'-G-del) fehlte. Die maximale Produktion beider Zytokine wurde, wie bei der ursprünglichen CpG-2216 Sequenz, mit der höchsten Konzentration von CpG-2216 5'-G-del erreicht. Die maximalen Mengen an IFN- $\alpha$  und IL-6 lagen aber etwas unter der, die mit CpG-2216 erreicht werden konnten. Zudem nahm die produzierte Zytokinmenge mit abnehmendem Stimulus stärker ab (Abb. 3.15).

Die fehlende Guanosin-Kette am 3'-Ende (CpG-2216 3'-G-del) führte jedoch zum annähernd kompletten Verlust der Induktion von IFN- $\alpha$  und IL-6 Produktion (Abb. 3.15).

So lässt sich sagen, dass die Kette von Guanosinen am 3'-Ende deshalb für die Induktion von Zytokinen, inklusive IFN- $\alpha$  und IL-6, wichtiger zu sein scheint, als der Anhang am 5'-Ende, da ohne ihn keinerlei Zytokine produziert wurden. Fehlte jedoch am 5'-Ende die Guanosin-Kette, zeigte das nahezu keine Auswirkungen auf die Fähigkeit Zytokine zu induzieren.



**Abb. 3.15: Einfluss der poly-G Anhänge am 3' und 5' Ende von CpG-2216 auf die Produktion von IFN- $\alpha$  und IL-6.** Stimulation der FL-BM DZ ( $1,75 \times 10^6$  Zellen/ml) mit CpG-2216, CpG-2216 PD, CpG-2216 5'-G-del oder CpG-2216 3'-G-del. Analyse der IFN- $\alpha$  und IL-6 Produktion mittels ELISA.

### 3.3.4 Spezies-Spezifität von CpG-2216, CpG-1668, CpG-2006 und CpG-2006polyG

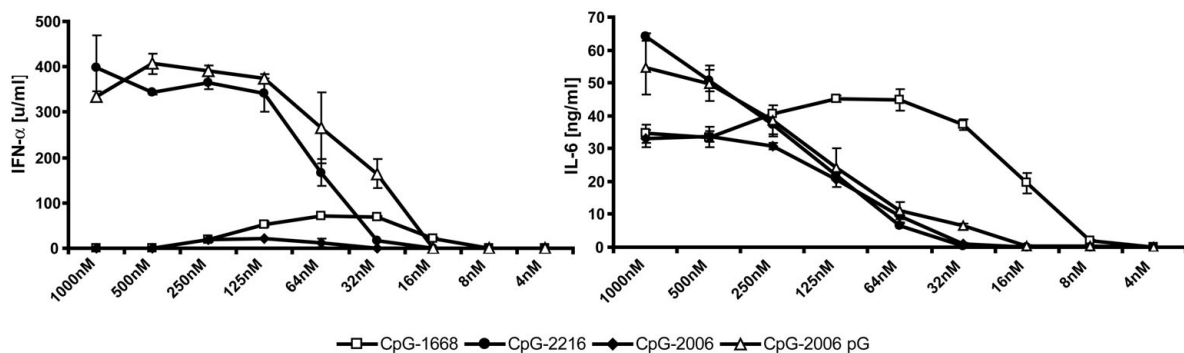
Neben den CpG-ODN Typen A und B wurden auch Sequenzen innerhalb des B-Typs identifiziert, die auf eine Spezies spezifische Erkennung deuten [Bauer, 2001]. Wobei die flankierenden Regionen um das CG-Kernmotif von entscheidender Bedeutung sind. So reagieren murine Zellen besser auf die Kern-Sequenz GACGTT mit insgesamt nur einem CG Motif (z. B.: CpG-1668), während humane Immunzellen besser auf ein Typ B CpG-ODN reagieren, das mehrere CG Motife enthält und dessen Kern-CG folgende Sequenz aufweist: GTCGTT (z. B.: CpG-2006). Beide CpG-ODN haben ein Rückgrat mit Phosphothioat Bindungen anstatt Phosphodiestern, was die Resistenz der Oligonukleotide gegenüber Nukleasen in der Zelle erhöht [Krieg, 2002].

Wie in der vorhergegangenen Kapiteln bereits beschrieben, konnten durch Modifikationen des Rückgrats und der 5'/3' Enden, die unterschiedliche Induktion der IFN- $\alpha$  Produktion durch die CpG-ODN 2216 (Typ A) und 1668 (Typ B), aufgehoben werden. Es stellt sich nun die Frage, ob durch solche Modifikationen die Spezies spezifische Reaktionen ebenfalls verändert werden kann. Zu diesem Zweck wurden an die ursprüngliche Sequenz von CpG-2006 an das 5' und an das 3' Ende Guanosin-Ketten angefügt und zusätzlich die Bindungen des Rückgrats der DNA verändert. Die CpG tragende Sequenz enthielt nur noch Phosphodiester Bindungen, während die Guanosin-Ketten durch Phosphothioate stabilisiert wurden. So entstand ein Typ B CpG-ODN, das seiner inneren Kernsequenz nach als human spezifisch definiert war. Durch die Modifikationen der Enden und des Rückgrates, glich es aber nun dem Typ A CpG-ODN 2216 das als immunstimulatorisch sowohl für humane als auch für murine Zellen beschrieben ist. Die genauen Sequenzen sind der Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Name	Sequenz
2006:	5'- G*G*G*T*C*G*T* <u>C*G</u> *T*T*T*G*TC*G*T*T*T*G*T* <u>C*G</u> *T*T
2006-pG:	5'-G*G*G G G T C G T <u>C G T T T T G T C G T T T T G T C G T T G*G*G*G*G</u>
1668:	5'- T*C*C*A*T*G*A* <u>C*G</u> *T*T*C*C*T*G*A*T*G*C*T
2216:	5'- G*G*G G G A <u>C G A T C G T C</u> *G*G*G*G*G

Tab. 3.5: Sequenzen der CpG-ODN 2216, 2006, 2006pG und 1668. Unterstrichen sind die jeweiligen CpG-Motife, \* zeigt eine Phosphothioat-Bindung zwischen den Nukleotiden an.

Nach der Stimulation von FL-BM DZ für 23 h mit diesen CpG-ODN wurde im Kulturüberstand die Produktion von IFN- $\alpha$  und IL-6 mittels ELISA gemessen. Ohne Modifikationen induzierten die beiden Typ B CpG-ODN 1668 und 2006 in hohen Konzentrationen kein IFN- $\alpha$ , im Gegensatz zum Typ A, CpG-2216, welches bei hohen Konzentrationen in der Lage war viel IFN- $\alpha$  zu induzieren (siehe auch Abb. 3.6). CpG-1668 und CpG-2006 waren lediglich bei niedrigen Konzentrationen (ab 125 nM) in der Lage IFN- $\alpha$  in geringen Mengen zu induzieren. Die Induktion von CpG-2006 befand sich sogar nur knapp über dem Detektionslimit. (Abb. 3.16). Auch bei der Induktion von IL-6 glichen sich die Kurven der beiden Typ B CpG-ODN 1668 und 2006 in dem sie mit den höchsten CpG-Konzentrationen ein Plateau an produziertem IL-6 zeigen, auch wenn wieder die produzierten Mengen durch CpG-2006 Stimulation geringer waren als mit CpG-1668. Diese verringerte Zytokinproduktion als Reaktion auf CpG-2006 lässt sich gut mit der beschriebenen Spezies-Spezifität erklären, wonach murine Immunzellen auf diesen Typ Oligo nicht so gut reagieren, wie humane Zellen. Durch die Modifikationen zeigte sich jedoch, dass das humanspezifische CpG-2006 ebenfalls in der Lage war murine FL-BM DZ zu hoher IFN- $\alpha$  und IL-6 Produktion anzuregen und das im gleichen Ausmaß wie das Typ A CpG-2216 (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16: Einfluss der poly-G Anhänge am 3' und 5' Ende von humanspezifischen CpG-2006 auf die Produktion von IFN- $\alpha$  und IL-6 nach Stimulation muriner FL-BM DZ.**  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml wurden mit CpG-2216, CpG-1668, CpG-2006 oder CpG-2006-pG aktiviert und die IFN- $\alpha$  und IL-6 Produktion mittels ELISA analysiert.

Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Aktivierung der DZ unabhängig von der Kernsequenz des verwendeten CpG-ODN ist und es in diesem Sinne keine Spezies-Spezifität der CpG-ODN gibt. Die Fähigkeit, die Produktion von IFN- $\alpha$  zu induzieren, hängt somit lediglich von den Modifikationen an den Enden der CpG-Oligonukleotide ab.

### 3.4 TLR9 unabhängige und abhängige Erkennung von HSV-1

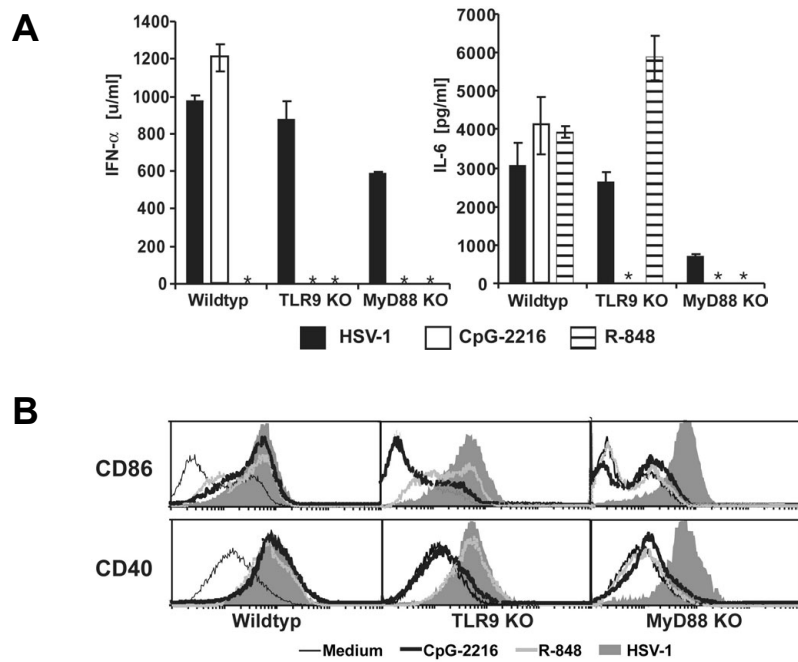
Neben nicht-methylierter, bakterieller DNA, bzw. CpG-ODN können pDZ auch durch verschiedene Viren wie z.B. Sendai-Virus [Ito, 2002], Influenza-Virus [Cella, 1999] oder Herpes simplex Virus-1 (HSV-1) [Gilliet, 2002; Brawand, 2002] zur Produktion großer Mengen IFN- $\alpha$  angeregt werden. Von diesen Modell-Viren besitzt HSV-1 eine doppelsträngige DNA als Genom und zu Beginn der Arbeit war noch nicht geklärt, ob virale DNA ein natürlicher Ligand für TLR9 ist. In den folgenden Kapiteln wurde näher untersucht, in wie weit TLR9 bei der Aktivierung von pDZ durch HSV-1 beteiligt ist.

#### 3.4.1 FL-BM DZ aus TLR9 und MyD88 defizienten Mäusen produzieren IFN- $\alpha$ als Immunantwort auf Stimulation mit HSV-1

Um zu testen, ob TLR9 oder das für viele TLRs essentielle Adaptorprotein MyD88 bei der Erkennung von HSV-1 eine Rolle spielt, wurde aus Knochenmark von Wildtyp, TLR9 KO und MyD88 KO Mäusen FL-BM Kulturen angesetzt, die nach 8-9 Tagen typischerweise pDZ als auch cDZ enthielten (s. Abb. 3.1 A). Die Kulturzellen wurden dann mit HSV-1, CpG-2216 oder R-848 stimuliert und die Menge an produzierten IFN- $\alpha$  und IL-6 im Kulturüberstand mittels ELISA gemessen. Der TLR9 Ligand CpG-2216 und der TLR7 Ligand R-848 wurden als Kontrollen verwendet.

Wie erwartet induzierte CpG-2216 TLR9 und MyD88-abhängig IFN- $\alpha$  und IL-6 in großen Mengen (Abb. 3.17 A). Der TLR7 Ligand R-848 induzierte sowohl in den Zellen des Wildtyps, als auch in den TLR9 KO Zellen IL-6, war jedoch bei den MyD88 KO Zellen komplett stumm. Wie bereits zuvor beschrieben (Abb. 3.4) war R-848 nicht in der Lage in den FL-BM DZ detektierbare Mengen an IFN- $\alpha$  zu induzieren.

Im Gegensatz dazu induzierte HSV-1 unerwarteter Weise die Produktion von IFN- $\alpha$  und IL-6 in den FL-BM DZ nicht nur von den Wildtyp, sondern auch von den TLR9 und MyD88 defizienten Mäusen. Jedoch waren die IL-6 Mengen bei den FL-BM DZ aus den MyD88 KO Mäusen deutlich reduziert (Abb. 3.17 A).



**Abb. 3.17: FL-BM generierte DZ werden durch HSV-1 unabhängig von TLR9 und MyD88 aktiviert.**  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml aus Kulturen von Wildtyp, TLR9 KO und MyD88 KO Mäusen wurden mit HSV-1 ( $1 \times 10^7$  pfu/ml), CpG-2216 ( $1 \mu\text{M}$ ) oder R-848 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. (A) Die Überstände der Stimulation wurden mittels ELISA auf die Produktion von IFN- $\alpha$  und IL-6 untersucht. HSV-1 (schwarzer Balken) induzierte beide Zytokine TLR9 und MyD88 unabhängig, CpG-2216 (weißer Balken) induzierte nur in den Wildtypzellen IFN- $\alpha$  und IL-6 und R-848 (gestreifter Balken) war lediglich MyD88 abhängig, aber nicht in der Lage IFN- $\alpha$  zu produzieren. Sternchen weisen auf nicht detektierbare Zytokinmengen hin. (B) Die stimulierten Zellen und die unstimulierten Kontrollzellen (dünner Strich) wurden mit Antikörper gegen CD86 und CD40 gefärbt. Beide Oberflächenmoleküle wurden durch HSV-1 (grau hinterlegtes Histogramm) auch auf TLR9 KO und MyD88 KO Zellen exprimiert. Die anderen Stimuli CpG-2216 (dicke, schwarze Linie) und R-848 (graue Linie) zeigten eine komplette MyD88 abhängige Aktivierung der Zellen.

Die Reifung der FL-BM DZ im Zusammenhang mit der Stimulation mit den TLR7 / TLR9 Liganden oder HSV-1 wurde anhand der Expression der Oberflächenmarker CD40 und CD86 bestimmt. Die Responsivität auf die TLR-Liganden CpG-2216 und R-848 war wie erwartet komplett MyD88 abhängig und für CpG-2216 zusätzlich TLR9 abhängig (Abb. 3.17 B).

Die Reifung der DZ als Antwort auf HSV-1 war sowohl TLR9 als auch MyD88 unabhängig, da die Zellen aus beiden Mäusetypen eine erhöhte Expression beider Aktivierungsmarker nach Stimulation mit HSV-1 auf ihrer Oberfläche zeigten (Abb. 3.17 B).

Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass weder die Expression von TLR9, noch von MyD88, dem essentiellen Adaptormolekül für TLR9 und TLR7, für die Aktivierung der FL-BM DZ mittels HSV-1, nötig ist.

Die Beobachtung, dass HSV-1 von TLR9 und MyD88 unabhängig erkannt wurde, war sehr überraschend, da angenommen wurde, dass das doppelsträngige (ds) DNA Genom des Virus die Aktivierung der DZ vermittelt. Aber noch war unklar, ob tatsächlich die pDZ der FL-BM Kultur die IFN- $\alpha$  Produzenten auf die HSV-1 Stimulation waren.

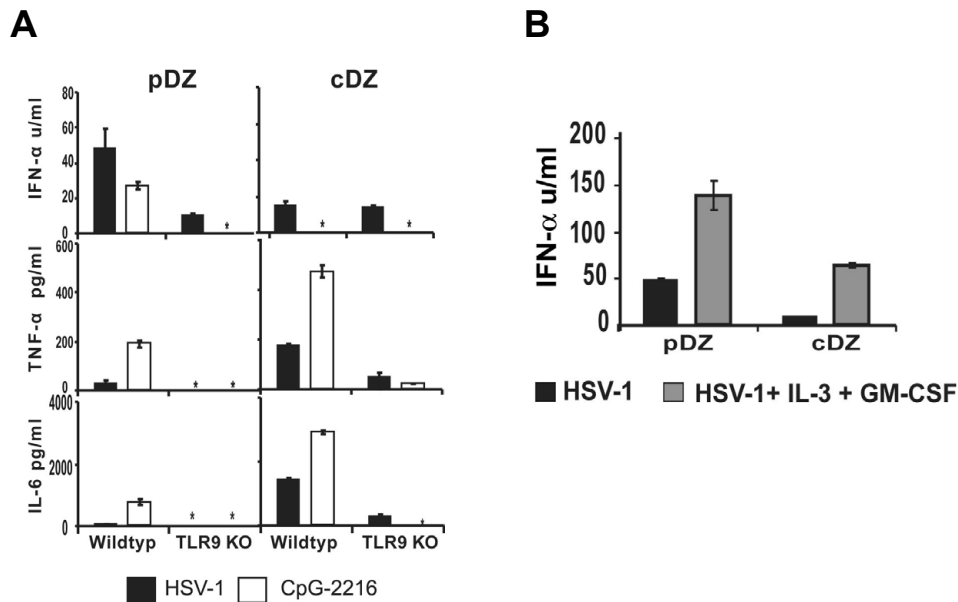
### 3.4.2 FL-BM cDZ und pDZ produzieren IFN- $\alpha$ auf Stimulation mit HSV-1 TLR9 unabhängig

Um die IFN- $\alpha$  Quelle innerhalb der gemischten FL-BM Kulturzellen aus Wildtyp (WT) und TLR9 KO Mäusen zu identifizieren, wurden die plasmazytoiden DZ (CD11c<sup>+</sup>; CD45RA<sup>high</sup>; CD11b<sup>low</sup>) und die konventionellen DZ (CD11c<sup>+</sup>; CD45RA<sup>neg</sup>; CD11b<sup>high</sup>) mittels eines Zellsortierers von einander getrennt. Die Reinheit der getrennten Populationen betrug 97%. Beide Populationen wurden im Anschluss getrennt von einander mit HSV-1 [ $1 \cdot 10^7$  pfu/ml] und als TLR9 Kontrolle mit CpG-2216 [1  $\mu$ M] für mindestens 18 h stimuliert. Wie in Abb. 3.18 A gezeigt, produzierten die pDZ aus den Wildtyp Mäusen auf CpG-2216 IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und IL-6, die cDZ hingegen produzierten TNF- $\alpha$  und IL-6, jedoch kein IFN- $\alpha$ . Wie erwartet, wurden keine Zytokine durch CpG-2216 in den pDZ oder cDZ der TLR9 KO Mäuse induziert.

Unerwarteter Weise produzierten neben den pDZ, auch die cDZ IFN- $\alpha$  als Antwort auf die HSV-1 Stimulation. Die IFN- $\alpha$  Produktion war zudem bei beiden Zellpopulationen TLR9 unabhängig, jedoch war in den TLR9 KO pDZ die IFN- $\alpha$  Produktion als Reaktion auf das Virus deutlich reduziert und auch TNF- $\alpha$  und IL-6 ließen sich nicht mehr nachweisen, was darauf hindeutet, dass die HSV-1 Erkennung in den gereinigten pDZ zum Großteil, aber nicht ausschließlich, TLR9 abhängig ist.

Im Gegensatz dazu blieb die produzierte Menge an IFN- $\alpha$  in den TLR9 KO cDZ als Reaktion auf das Virus nahezu unverändert, jedoch nahmen die produzierten Mengen an TNF- $\alpha$  und IL-6 im Vergleich zu den cDZ aus den Wildtypmäusen auch hier ab. Diese Abnahme könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-6 der cDZ teilweise TLR9 abhängig ist, die IFN- $\alpha$  Produktion der cDZ jedoch völlig TLR9 unabhängig induziert wird (Abb. 3.18 A).





**Abb. 3.18: ELISA für IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 nach Stimulation mit HSV-1 (schwarz) oder CpG-2216 (weiß).** Von einander getrennte pDZ und cDZ ( $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml) aus Wildtyp und TLR9 KO FL-BM Kulturen. **(A)** cDZ waren fähig auf HSV-1 Stimulation IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 in TLR9 unabhängiger Weise zu produzieren. Sterne kennzeichnen nicht detektierbare Zytokin-Mengen. **(B)** Sowohl pDZ als auch cDZ ( $5 \times 10^5$  Zellen/ml) produzierten mehr IFN- $\alpha$  auf HSV-1, wenn zur Stimulation zusätzlich IL-3 (10 ng/ml) und GM-CSF (10 ng/ml) zugesetzt wurde (grauer Balken).

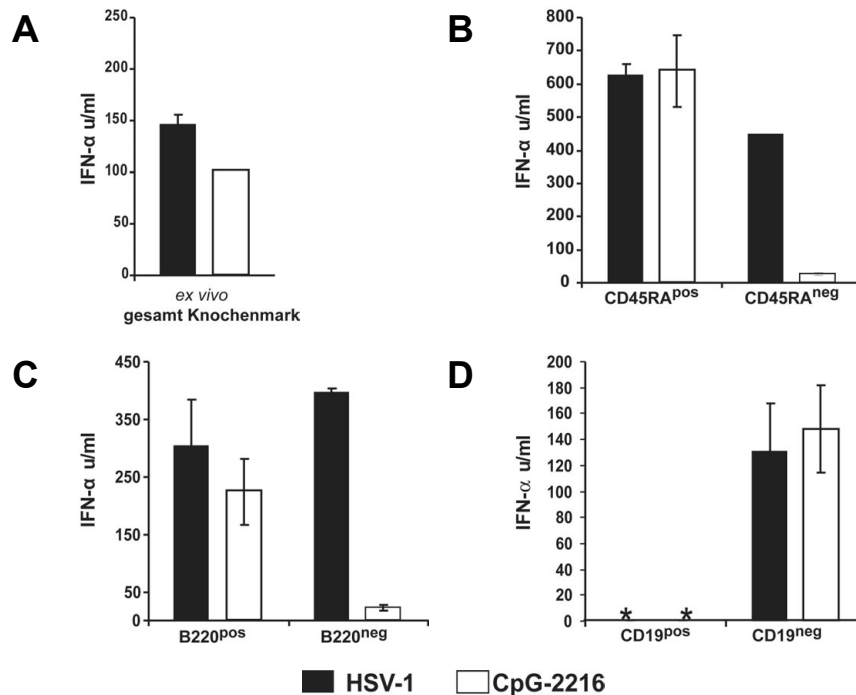
Da die Menge an produzierten IFN- $\alpha$  relativ gering war, wurde eine Möglichkeit gesucht, wie man die Produktion erhöhen könnte. Ein Ansatz war eine Publikation von Cederblad *et al.* (1991) in der beschrieben wurde, dass bei humanen PBMC (periphere Blut mononukleäre Zellen) die zusätzliche Gabe von IL-3 und GM-CSF die IFN- $\alpha$  Produktion bei Stimulationen mit HSV förderte. Um zu testen, ob dieser Effekt auch bei den FL-BM DZ zutrifft, wurden beide Zytokine und HSV-1 zu den Zellen gegeben und es zeigte sich, dass auch die FL-BM pDZ und cDZ zusammen mit GM-CSF und IL-3 mehr IFN- $\alpha$  auf HSV-1 produzierten als ohne diesen Zytokincocktail (Abb.3.18 B).

Aus diesem Grund wurden für viele der nachfolgenden Versuche diese Zytokine bei der viralen Stimulation mit eingesetzt.

### 3.4.3 Ex vivo isolierte Knochenmarkszellen produzieren IFN- $\alpha$ auf HSV-1 Stimulation TLR9 unabhängig

Nachdem offensichtlich war, dass neben den pDZ auch die cDZ aus der FL-BM Kultur in der Lage sind IFN- $\alpha$  als Immunantwort auf HSV-1 TLR9 unabhängig zu produzieren (Abb. 3.18), wurde als Nächstes untersucht, ob diese Fähigkeit auch in *ex vivo* isolierten Knochenmarkszellen auftritt.

In Abb. 3.19 A ist die IFN- $\alpha$  Produktion, als Reaktion auf CpG-2216 [1 $\mu$ M] und HSV-1 [1x10<sup>7</sup> pfu/ml], von unseparierten, *ex vivo* isolierten Knochenmark aus Wildtyp Mäusen dargestellt. Auf beide Stimuli reagierten die Gesamt-Knochenmarkszellen mit der Bildung von IFN- $\alpha$ .



**Abb. 3.19: Ex vivo isolierte Knochenmarkszellen aus Wildtypmäusen wurden durch HSV-1 zur IFN- $\alpha$  Produktion angeregt.** (A) Gesamte (2,5x10<sup>6</sup>/ml +IL-3+GM-CSF), (B) CD45RA angereicherte (2,5x10<sup>6</sup>/ml), (C) B220 angereicherte (2,5x10<sup>6</sup>/ml) oder (D) CD19 angereicherte (1x10<sup>6</sup>/ml) frisch isolierte Knochenmarkszellen wurden mit HSV-1 (schwarzer Balken) oder CpG-2216 (weißer Balken) stimuliert. Die Überstände wurden mittels ELISA auf die Produktion von IFN- $\alpha$  analysiert. Sowohl die CD45RA pos und neg als auch die B220 pos und neg Zellen produzierten IFN- $\alpha$  als Antwort auf HSV-1 Stimulation. Bei den CD19 fraktionierten Zellen reagierte nur die CD19 neg Zellen mit IFN- $\alpha$  Produktion auf beide Stimuli. Sterne kennzeichnen nicht detektierbare Mengen an IFN- $\alpha$ .

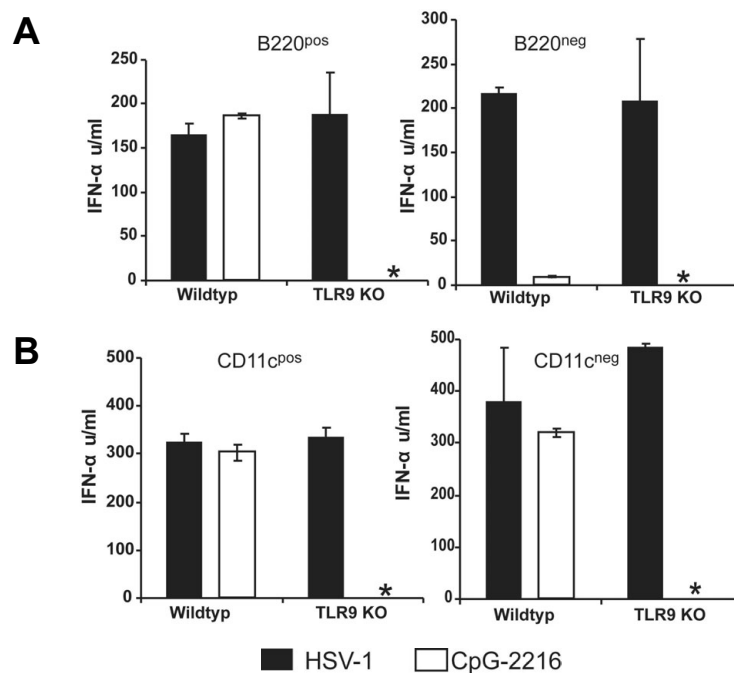
Da bekannt ist, dass plasmazytoide DZ (pDZ) CD45RA und B220 auf ihrer Oberfläche tragen, wurden diese Marker verwendet, um innerhalb der *ex vivo* isolierten Knochenmarkszellen die IFN- $\alpha$  Produzenten zu definieren. Mit Hilfe von Antikörpern gegen CD45RA oder

B220 und magnetischer Zelltrennung (MACS) (s. 2.8.1) wurden die Zellen entweder für CD45RA oder B220 angereichert. Bei der Stimulation mit CpG-2216 zeigte sich, dass die Hauptproduzenten für IFN- $\alpha$  in den CD45RA<sup>pos</sup> und B220<sup>pos</sup> Fraktionen zu finden waren, wohingegen in den negativen Fraktionen kaum eine IFN- $\alpha$  Produktion nachzuweisen war (Abb. 3.19 B+C).

Eine wichtige Beobachtung war aber die Tatsache, dass sowohl die CD45RA negativen als auch die B220 negativen Zellen in der Lage waren große Mengen an IFN- $\alpha$  zu produzieren, wenn sie mit HSV-1 stimuliert wurden. Das ließ die Vermutung zu, dass Zellen, die einen anderen Phänotyp als die „klassischen“ pDZ aufweisen ebenfalls in der Lage sind IFN- $\alpha$  als Antwort auf HSV-1 zu produzieren.

Da CD45RA und B220 auch auf B-Zellen exprimiert wird, sollte getestet werden, ob B-Zellen für die gemessene IFN- $\alpha$  Produktion der CD45RA und B220 positiven Fraktionen verantwortlich sind. Dazu wurden die Gesamtzellen aus dem *ex vivo* isolierten Knochenmark anhand ihrer CD19 Expression, ein spezifischer Marker für B-Zellen, in zwei Fraktionen getrennt. Beide Fraktionen, CD19 positive und CD19 negative, wurden wieder mit CpG-2216 und HSV-1 stimuliert. Die IFN- $\alpha$  Produzenten waren für beide Stimuli nur in der CD19 negativen Fraktion zu finden. Somit konnten die B-Zellen, eine der Hauptpopulationen im Knochenmark, als IFN- $\alpha$  Produzenten auf HSV-1 ausgeschlossen werden (Abb. 3.19 D).

Als Nächstes wurde untersucht, ob die IFN- $\alpha$  Produktion der B220 negativen Zellen auf HSV-1 Stimulation auch in den *ex vivo* isolierten Knochenmarkszellen TLR9 unabhängig war. Der Vergleich der IFN- $\alpha$  Produktion zwischen B220 selektierten Zellen aus Wildtyp und TLR9 KO Mäusen zeigte, dass sowohl die B220<sup>+</sup>, pDZ angereicherte, als auch die B220<sup>-</sup>, pDZ depletierte, Fraktion vergleichbare Mengen an IFN- $\alpha$  in TLR9 unabhängiger Weise auf die HSV-1 Stimulation produzierten (Abb. 3.20 A). Die CpG-2216 Stimulation, als TLR9 Kontrolle, zeigte wie erwartet nur IFN- $\alpha$  Produktion in den B220 positiven Wildtypzellen.



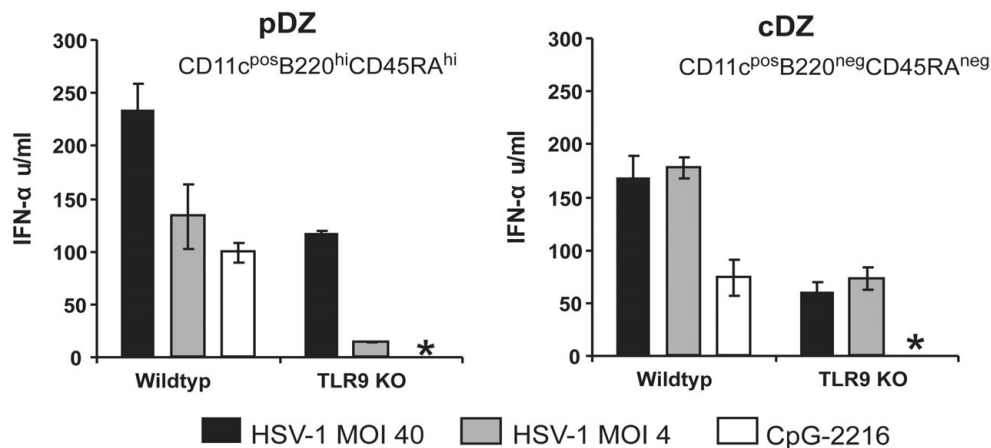
**Abb. 3.20: Sowohl angereicherte pDZ als auch cDZ aus *ex vivo* isolierten Knochenmarkszellen von Wildtyp und TLR9 KO Mäusen produzieren TLR9 unabhängig IFN- $\alpha$  auf HSV-1 Stimulation. (A) B220 fraktionierte oder (B) CD11c fraktionierte Knochenmarkszellen aus Wildtyp und TLR9 KO Mäusen ( $2,5 \times 10^6$ /ml) wurden mit HSV-1 [ $1 \times 10^7$  pfu/ml] (schwarze Balken) oder CpG-2216 [ $1 \mu\text{M}$ ] (weiße Balken) stimuliert und der Überstand mittels ELISA auf IFN- $\alpha$  Produktion analysiert. (A) Sowohl die B220 pos als auch die B220 neg Fraktion produzierten, TLR9 unabhängig, vergleichbare Mengen IFN- $\alpha$  als Antwort auf HSV-1. (B) Gleiches trifft auch für die CD11c pos und CD11c neg Fraktionen zu. Sterne zeigen nicht detektierbare Zytokin-Mengen an.**

Da die *ex vivo* Daten mit den totalen Knochenmarkszellen und mit den CD45RA bzw B220 fraktionierten Knochenmarkszellen die pDZ als alleinige IFN- $\alpha$  Produzenten gegen HSV-1 Infektionen ausschließen (Abb. 3.19 A B C), wurden *ex vivo* isolierten Zellen aus dem Knochenmark erneut fraktioniert. Diesmal auf Basis ihrer CD11c Expression, einen allgemeinen Marker für Dendritische Zellen. Die CD11c<sup>pos</sup> Fraktion stellte nur 3% aller Knochenmarkszellen. Nach der Anreicherung der CD11c positiven Zellen betrug die Reinheit der Population 75-90%. Davon waren etwa 40% zudem B220 positiv, welche die Population der pDZ darstellt. Sowohl die CD11c angereicherten als auch die CD11c depletierten Knochenmarkszellen waren in der Lage IFN- $\alpha$  auf HSV-1 und sogar auf CpG 2216 zu produzieren. Des Weiteren war diese IFN- $\alpha$  Produktion, im Zusammenhang mit der HSV-1 Stimulation, vollständig unabhängig von TLR9 (Abb. 3.20 B).

Somit lässt sich aus den Daten der CD11c Selektion folgern, dass im Knochenmark sowohl Dendritische Zellen als auch „Nicht“- Dendritische Zellen als Immunantwort gegen HSV-1 in der Lage sind TLR9 unabhängig IFN- $\alpha$  zu produzieren.

Als nächster Schritt wurde in den frisch isolierten Knochenmarkszellen die CD11c<sup>pos</sup>-Fraktion näher untersucht. Dazu wurden aus den Gesamt-Knochenmarkszellen die CD11c<sup>pos</sup> Zellen mit Hilfe von Antikörpern und magnetischen Beads (MACS-Selektion) (s. 2.8.1) isoliert und

anschließend mit einem Zellsortierer in zwei hochreine Populationen getrennt. Zum einen in plasmazytoide DZ (CD11c<sup>+</sup>; CD45RA<sup>high</sup>; B220<sup>high</sup>) und zum anderen in eine heterogene Gruppe die konventionelle DZ (cDZ) (CD11c<sup>+</sup>; CD45RA<sup>neg</sup>; B220<sup>neg</sup>) genannt wurde.



**Abb. 3.21: IFN- $\alpha$  Produktion von gereinigten pDZ und cDZ aus *ex vivo* isolierten Knochenmark.** Stimulation mit HSV-1 in den Konzentrationen MOI 40, (schwarz), MOI 4 (grau) oder mit CpG-2216 [1 $\mu$ M] (weiß). Sowohl die pDZ als auch die cDZ aus den Wildtypmäusen waren in der Lage auf alle drei Stimulationen IFN- $\alpha$  zu produzieren. In den TLR9 KO Zellen konnten ebenfalls sowohl die pDZ als auch die cDZ mit IFN- $\alpha$  Produktion auf eine HSV-1 Infektion reagieren. In den cDZ zeigte sich zusätzlich, dass die produzierte Menge an Zytokin unabhängig war von der Konzentration des Virus. Sterne zeigen nicht detektierbare Zytokin-Mengen an.

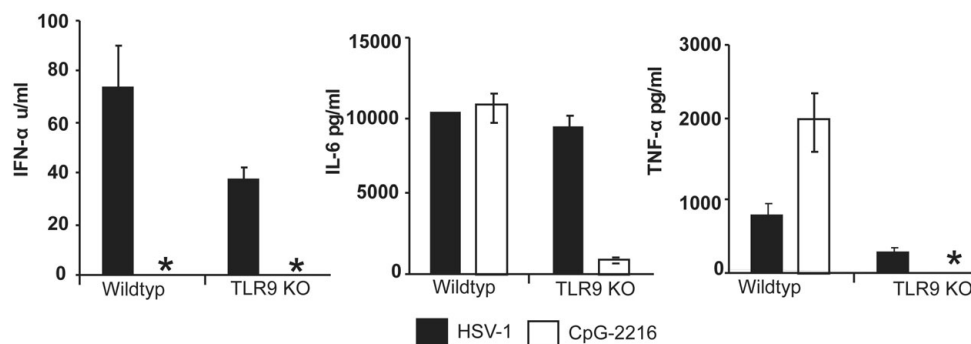
Beide Zellpopulationen wurden getrennt voneinander mit CpG-2216 [1  $\mu$ M] und zwei unterschiedlichen Konzentrationen an HSV-1 [MOI 40 und MOI 4; MOI=*multiplicity of infection* = Viren pro Zelle] für mind. 18 h stimuliert. Überraschender Weise produzierten sowohl die reinen pDZ als auch die cDZ aus Wildtypmäusen auf CpG-2216 und HSV-1 Stimulation IFN- $\alpha$  (Abb. 3.21). Zusätzlich produzierten die pDZ nur dann mehr IFN- $\alpha$  als die cDZ, wenn sie mit einer höheren MOI des Virus stimuliert wurden. Diese Abhängigkeit von einer großen Viruslast wurde in TLR9 KO Zellen noch deutlicher. Im Gegensatz dazu blieb die TLR9-unabhängige IFN- $\alpha$  Produktion der cDZ bei beiden getesteten Virus-Konzentrationen gleich (Abb. 3.21).

Somit wurde deutlich, dass mehrere Fraktionen der *ex vivo* isolierten Knochenmarkszellen (pDZ, cDZ, CD11c<sup>+</sup>, und CD19<sup>neg</sup>/CD11c<sup>neg</sup>), in TLR9 abhängiger als auch in unabhängiger Weise, große Mengen an IFN- $\alpha$  als Immunantwort auf HSV-1 produzieren können. Die gleichen Beobachtungen mit *ex vivo* isolierten Knochenmarkszellen konnten auch mit einem anderen HSV-1 Stamm (HSV-1 KOS) gemacht werden und dadurch Stamm-spezifische Unterschiede innerhalb der Familie der HSV-1 Viren ausgeschlossen werden.

### 3.4.4 GM-CSF DZ produzieren IFN- $\alpha$ auf HSV-1 Stimulation TLR9 unabhängig

Um sicher zu gehen, dass tatsächlich die cDZ, sowohl die aus der FL-BM Kultur als auch die *ex vivo* isolierten, mit IFN- $\alpha$  Produktion auf HSV-1 reagierten und nicht eine pDZ Population, die phänotypisch noch nicht voll entwickelt war, wurden mit einem Kultursystem mittels GM-CSF reine cDZ aus Knochenmarkszellen generiert (GM-DZ) (s. 2.3.4). Mit diesem klassischen Kultursystem für DZ wurden Zellen generiert, die zwar Dendritische Zellen waren, aber keinerlei Marker für pDZ (CD45RA<sup>neg</sup>; B220<sup>neg</sup>) aufwiesen. Somit waren diese Zellen ideal, um zu testen, ob eine normale DZ Population tatsächlich fähig war IFN- $\alpha$  auf virale Stimulation hin zu produzieren. Dazu wurden die GM-DZ mit CpG-2216 [1 $\mu$ M] und HSV-1 [1x10<sup>7</sup> pfu/ml] stimuliert. Die freigesetzten Zytokine IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 wurden mittels ELISA im Kulturüberstand nachgewiesen.

Die GM-DZ reagierten auf die Stimulation mit CpG-2216 mit der Produktion von IL-6 und TNF- $\alpha$ , jedoch nicht, wie schon durch Diebold *et al*, 2004 beschrieben, mit der Produktion von IFN- $\alpha$  (Abb. 3.22). Zudem war die Reaktion auf CpG-2216, wie erwartet, komplett TLR9 abhängig. Die geringe Menge an IL-6, die bei den TLR9 KO GM-DZ nach Stimulation mit CpG-2216 detektiert wurde, entsprach jener Menge an IL-6, die von den Zellen konstitutiv auch ohne Stimulus produziert wurde.



**Abb. 3.22: GM-CSF generierte DZ produzieren ebenfalls auf HSV-1 IFN- $\alpha$ .** DZ (2,5x10<sup>6</sup> Zellen /ml) aus GM-CSF Kulturen von Wildtyp und TLR9 KO Mäusen wurden mit HSV-1 (schwarzer Balken) oder mit CpG-2216 (weißer Balken) stimuliert und die Überstände mittels ELISA auf die Produktion der Zytokine IFN- $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$  analysiert. Alle drei Zytokine wurden von den GM-CSF DZ auch TLR9 unabhängig als Reaktion auf HSV-1 produziert. CpG-2216 induzierte, wie erwartet, nur in den Wildtyp Zellen die Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$ . Sterne zeigen nicht detektierbare Zytokin-Mengen an.

Im Gegensatz dazu reagierten die gleichen Zellen auch ohne TLR9 auf HSV-1 mit der Produktion von IFN- $\alpha$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  (Abb. 3.22).

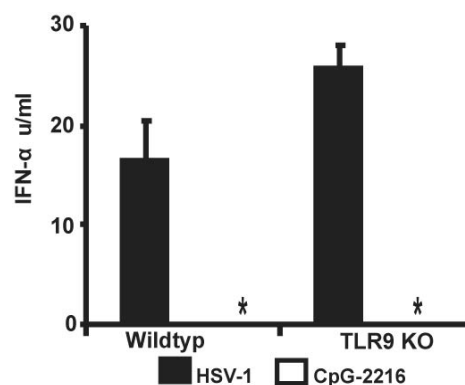
GM-DZ aus MyD88 KO Mäusen produzierten ebenfalls IFN- $\alpha$  als Antwort auf eine Stimulation mit HSV-1.

Da die hier verwendeten DZ aus einer GM-CSF Kultur stammten, kann nun definitiv gefolgert werden, dass auch cDZ, ohne jeglichen Einfluss von pDZ, in der Lage waren auf HSV-1 Stimulation IFN- $\alpha$  zu produzieren und dies unabhängig von TLR9.

Neben der Erkenntnis, dass auch cDZ IFN- $\alpha$  Produzenten sein können, legten die Ergebnisse mit dem fraktionierten Knochenmark (Abb. 3.20) nahe, dass auch eine nicht-dendritische, CD11c<sup>neg</sup> Fraktion, in der Lage war als Immunantwort auf eine HSV-1 Infektion IFN- $\alpha$  zu produzieren. Ob dafür Makrophagen in Frage kommen, wurde als Nächstes näher untersucht

### 3.4.5 Makrophagen produzieren IFN- $\alpha$ auf HSV-1 Stimulation TLR9 unabhängig

Um zu bestimmen, ob als Zelltyp für die IFN- $\alpha$  Produktion der CD11c<sup>neg</sup> Zellfraktion Makrophagen in Frage kommen, wurden aus Vorläuferzellen des Knochenmarks mit Hilfe des Wachstumsfaktors M-CSF *in vitro* Makrophagen generiert. Diese adhären Kulturzellen waren CD11c<sup>neg</sup> und B220<sup>neg</sup> und enthielten somit weder konventionelle DZ noch plasmazytoide DZ. Übereinstimmend mit früheren Berichten über die Abschwächung der Responsivität auf CpG-ODN durch M-CSF durch eine Herabregulierung von TLR9 [Sweet, 2002], war die Reaktion dieser *in vitro* generierten Makrophagen auf CpG-2216 nur sehr schwach. IFN- $\alpha$  war nicht detektierbar (Abb. 3.23) und nur minimale Mengen an IL-6 wurden durch die CpG-ODN Stimulation induziert (nicht gezeigt). HSV-1 hingegen induzierte in diesen Zellen sowohl die Produktion von IFN- $\alpha$  als auch die Produktion von IL-6 und diese Produktion war völlig TLR9 unabhängig.



**Abb. 3.23: M-CSF generierte Makrophagen reagieren auf Stimulation mit HSV-1 mit der TLR9 unabhängigen Bildung von IFN- $\alpha$ .** Zellen aus M-CSF generierten Makrophagen-Kulturen ( $2,5 \times 10^6$ /ml) von Wildtyp und TLR9 KO Mäusen wurden mit HSV-1 (schwarze Balken) oder CpG-2216 (weiße Balken) stimuliert und die Überstände mittels ELISA auf die Produktion von IFN- $\alpha$  analysiert. Nur HSV-1 war in der Lage die Produktion des Zytokins zu induzieren. Sterne zeigen nicht detektierbare Zytokin-Mengen an.

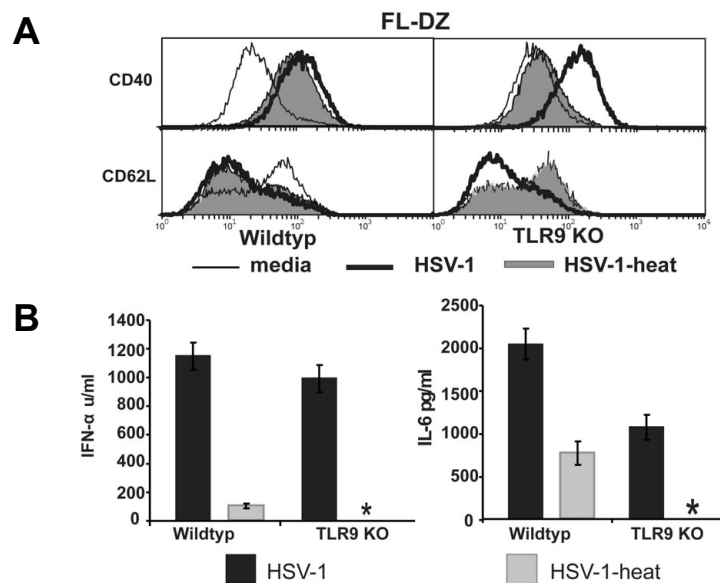
Somit konnte gezeigt werden, dass neben der kleinen Population der pDZ auch die große Population der Makrophagen in der Lage ist mit signifikanten Mengen an IFN- $\alpha$ , TLR9 unabhängig, auf eine HSV-1 Infektion zu reagieren.

Da die Menge der produzierten Zytokine der TLR9 KO DZ aber oft signifikant niedriger war als die der Wildtypzellen (z.B. Abb. 3.18 und 3.21), war dennoch die ursprüngliche Vermutung, dass TLR9 bei der Erkennung von HSV-1 eine Rolle spielt nicht ganz von der Hand zu weisen. Als abschließender Schritt wurde untersucht, ob HSV-1 auch als hitzeinaktiviertes Virus noch diese TLR9 Unabhängigkeit besaß.

### **3.4.6 Die Immunantwort auf hitzeinaktivierten HSV-1 ist TLR9 abhängig**

Um einen besseren Einblick in den Mechanismus der HSV-1 Erkennung 1 zu bekommen, wurde das Herpes Simplex Virus 1 durch Hitze modifiziert. Durch Kochen des Virus ging jegliche Immunreaktion als Antwort auf das so behandelte Virus in FL-BM Kulturzellen verloren. Dieser Effekt war höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass durch das Kochen wichtige Glykoproteine auf der Oberfläche des Virus denaturiert wurden, die für den Eintritt in die Wirtszelle essentiell sind und somit keine Infektion der Zellen mehr stattfinden konnte. Eine mildere Behandlung von HSV-1, 56°C für 30 min (HSV-1-heat), ergab eine Viruspräparation, die die Erhöhung der Expression von CD40 und die Herabregulierung von CD62L bei *in vitro* generierten FL-DZ zur Folge hatte. Diese Änderung der Aktivierungsmarker auf der Oberfläche der DZ war genauso hoch, wie jene die bei der Stimulation mit unbehandelten HSV-1 beobachtet werden konnte (Abb. 3.24 A).





**Abb. 3.24:** *In vitro* generierte DZ aus FL-BM Kulturen von Wildtyp und TLR9 KO Mäusen reagieren komplett TLR9 abhängig auf hitzeinaktivierten HSV-1. (A) FL-DZ ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden entweder mit HSV-1 (dicke, schwarze Linie) oder mit hitzeinaktivierten HSV-1 (30 min,  $56^\circ\text{C}$ ; HSV-1-heat, graue Linie) stimuliert und mit Antikörpern gegen die Aktivierungsmarker CD40 und CD62L gefärbt. Die Wildtypzellen reagierten sowohl auf unbehandelten, als auch auf hitzeinaktivierten HSV-1 mit der Regulation der Oberflächenmarker. Die Reaktion auf HSV-1-heat war jedoch komplett abhängig von TLR9. (B) Die Überstände der Stimulationen mit HSV-1 (schwarzer Balken) oder hitzeinaktivierten HSV-1 (grauer Balken) wurden auf die Produktion von IFN- $\alpha$  und IL-6 mittels ELISA analysiert. Auf hitzeinaktivierten Virus reagierten nur die Wildtypzellen mit der Produktion von IFN- $\alpha$  und IL-6. Sterne zeigen nicht detektierbare Zytokin-Mengen an.

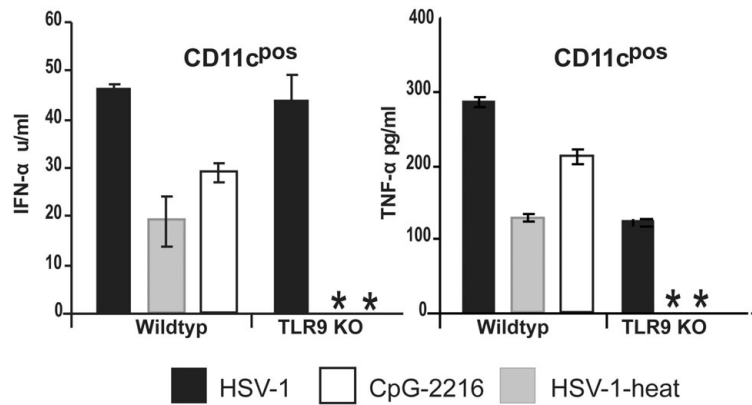
Im Vergleich mit unbehandeltem HSV-1 induzierte HSV-1-heat zwar deutlich reduzierte, aber immer noch detektierbare Mengen an IFN- $\alpha$  und IL-6 in den FL-DZ (Abb. 3.24 B).

In TLR9 defizienten FL-DZ hingegen konnte weder eine Regulierung der Oberflächenmarker CD40 und CD62L noch die Produktion von Zytokinen nach der Stimulation mit modifiziertem Virus nachgewiesen werden (Abb. 3.24 A / B).

Somit führte die Hitzebehandlung von HSV-1 zum Verlust der TLR9 unabhängigen Erkennung des Virus bei den *in vitro* generierten FL-DZ.

Um diese Daten auch mit *ex vivo* isolierten DZ zu bestätigen, wurden aus frisch isolierten Knochenmarkszellen von Wildtyp und TLR9 KO Mäusen die CD11c<sup>POS</sup> Zellen mittels MACS-Selektion isoliert (s. 2.8.1) und mit den beiden Virusvarianten stimuliert. In Übereinstimmung mit den Daten der FL-BM DZ zeigte sich, dass die Produktion von Zytokinen in diesen *ex vivo* Zellen, als Reaktion auf HSV-1-heat ohne TLR9 nicht induzierbar war (Abb. 3.25).

Somit lässt sich folgern, dass die Immunerkennung des mit Hitze behandelten HSV-1 ausschließlich durch TLR9 erfolgt.



**Abb. 3.25:** *Ex vivo* isolierte, CD11c angereicherte Zellen ( $2,0 \times 10^5$ /ml) aus dem Knochenmark reagierten auf HSV-1-heat nur in einer TLR9 abhängigen Weise. Überstände der Stimulationen mit HSV-1 (schwarzer Balken), hitzeinaktivierten HSV-1 (grauer Balken) oder CpG-2216 (weißer Balken) wurden auf die Produktion von IFN- $\alpha$  und TNF- $\alpha$  mittels ELISA analysiert. Sterne zeigen nicht detektierbare Zytokin-Mengen an.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HSV-1 über mindestens zwei Wege von Immunzellen erkannt wird. Zum einen existiert ein TLR9 /MyD88 unabhängiger Signalweg über den das voll funktionsfähige Virus erkannt werden kann, zum anderen existiert aber auch eine Erkennung, die von TLR9 abhängt. Als Auslöser dieser Immunreaktion kommt dafür das doppelsträngige DNA-Genom des Virus in Frage.

## 4. Diskussion

### 4.1 Generierung und Charakterisierung von murinen pDZ

#### 4.1.1 Flt3-L generierte DZ (FL-BM DZ) besitzen plasmazytoiden Phänotyp

Die seltenen Interferon produzierenden Zellen (IPZ), auch plasmazytoide DZ genannt, konnten aus Mäusen erst vor wenigen Jahren aus lymphoiden Organen isoliert werden. Die Schwierigkeit der Identifikation der murinen pDZ bestand darin, dass sich humane und murine pDZ in der Expression von Oberflächenmarkern unterscheiden, die für die Identifikation der humanen pDZ essentiell waren. Zu diesen unterschiedlichen Oberflächenmarkern zählen unter anderem CD123 und CD11c. Während bei humanen pDZ eine hohe Expression von CD123 auf ihrer Oberfläche nachgewiesen wurde, aber nicht CD11c, verhält es sich bei den murinen pDZ gegenteilig. CD123 ist kaum nachweisbar und der Oberflächenmarker CD11c ist bei Dendritischen Zellen (DZ) aus der Maus intermediär exprimiert. Als gemeinsamer Marker der pDZ aus beiden Spezies stellte sich CD45RA heraus [Asselin-Paturel, 2001; Bjorck, 2001; Nakano, 2001].

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein Kultursystem zu etablieren, mit dessen Hilfe es möglich wäre große Mengen der seltenen pDZ zu generieren. Als potentieller Wachstumsfaktor kam dafür Flt3-L in Frage, da Studien zeigten, dass sich durch Injektion von Flt3-L bei freiwilligen Versuchspersonen eine stark erhöhte Anzahl an pDZ im Blut feststellen ließ [Pulendran, 2000]. Zudem war bekannt, dass sich aus humanen, CD34<sup>pos</sup>, hämatopoetischen Stammzellen, mittels Flt3-L, Interferon produzierende Zellen generieren ließen [Blom, 2000]. Mit dieser Arbeit hier konnte gezeigt werden, dass es möglich ist durch die Kultivierung von frisch isolierten Knochenmarkszellen aus der Maus, zusammen mit dem Wachstumsfaktor Flt3-L, bis zu 90% an CD11c<sup>pos</sup> Zellen zu generieren. Von diesen CD11c<sup>pos</sup> Zellen waren am Tag 8-10 der Kultur bis zu 60% zudem CD45RA<sup>pos</sup>. Da CD11c ein typischer Oberflächenmarker für DZ ist, war dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass sich während der Kulturzeit aus den hämatopoetischen Vorläuferzellen zwei unterschiedliche Populationen an DZ entwickelten. Die CD11c<sup>pos</sup>/CD45<sup>neg</sup> Population der Kultur entsprach phänotypisch, aufgrund der starken Expression von CD11b<sup>pos</sup>, myeloiden bzw. konventionellen DZ (cDZ). Zudem konnten auf der Oberfläche dieser Zellfraktion die charakteristischen Marker für pDZ, CD45R (B220) und CD62L, nicht nachgewiesen werden.

Die doppelt-positive Zellpopulation der Kultur (CD11c<sup>pos</sup>/ CD45RA<sup>pos</sup>) stellte die potenzielle Fraktion der pDZ dar. Nach weiteren Analysen der exprimierten Oberflächenmarker wurde deutlich, dass die Fraktion der CD11c<sup>pos</sup>/CD45RA<sup>pos</sup> Zellen zusätzlich stark CD45R (B220), CD45RB und CD62L exprimiert, jedoch nicht CD8 $\alpha$ . Der Zellmarker für myeloide DZ, CD11b,

war nur schwach auf der Oberfläche dieser Zellpopulation nachweisbar. Ebenfalls nicht exprimiert wurden die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und der Aktivierungsmarker CD69. Phänotypisch entspricht diese Zellpopulation der Kulturzellen somit weitestgehend dem Phänotyp, der beschriebenen *ex vivo* isolierten pDZ aus der Maus.

#### 4.1.2 R-848 und CpG-DNA bewirken eine Aktivierung der Flt3-L generierten pDZ

##### Phänotypische Aktivierung

Dendritische Zellen stellen die Wächter des Immunsystems dar und sind zu diesem Zweck mit einer Reihe an *Pattern recognition receptors* (PRR) ausgestattet, zu denen auch die *Toll-like Rezeptoren* (TLR) zählen. Die Expression der TLR scheint bei den einzelnen Subtypen der DZ unterschiedlich reguliert zu sein. Bei humanen pDZ konnte z.B. gezeigt werden, dass diese DZ-Untergruppe nur die TLRs 7 und 9 exprimiert und somit auf die Erkennung viraler und bakterieller Nukleinsäuren spezialisiert ist [Bauer, 2001; Kadowaki, 2001; Hornung, 2002]. Zudem stellen die pDZ die einzige DZ-Population dar, welche im humanen Organismus TLR9 exprimiert. Dieses enge Expressionsmuster der TLRs ist bei murinen DZ aufgelockert. So zeigen mRNA Expressionsstudien, dass die murinen pDZ zwar hauptsächlich TLR7 und TLR9 exprimieren, aber auch mRNA der Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 konnte nachgewiesen werden [Brawand, 2002; Edwards, 2003; Okata, 2003]. Zudem wird im murinen Organismus TLR9 nicht exklusiv von den pDZ exprimiert. Ein weiterer Schritt zur Phänotypisierung der *in vitro* generierten cDZ und pDZ stellte die Analyse der Responsivität beider Zellfraktionen auf unterschiedliche TLR-Liganden dar. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Reaktion auf die Stimulation mit den Liganden für TLR2 (Pam3Cys), TLR3 (poly (I:C)), TLR4 (LPS), TLR7 (R-848) und TLR9 (CpG-DNA).

Die FL-BM pDZ reagierten auf die verschiedenen Stimulationen am stärksten mit der Regulierung von CD8 $\alpha$ , CD69 und CD62L.

Im Gegensatz zu den cDZ, deren Expression von CD8 $\alpha$  auch nach Stimulation negativ bleibt, scheint die Expression von CD8 $\alpha$  bei den pDZ ein Aktivierungsmarker zu sein. Denn sowohl die FL-BM pDZ als auch *ex vivo* isolierte pDZ exprimieren diesen Oberflächenmarker nach der Stimulation mit R-848 und CpG-DNA stark auf ihrer Zelloberfläche. Die Liganden der Toll-like Rezeptoren 2-4 induzierten jedoch keine Änderung der CD8 $\alpha$  Expression.

CD62L (L-Selectin) wird stark von den FL-BM pDZ und nicht von den FL-BM cDZ exprimiert. Die Expression von CD62L ist unbedingt nötig, damit Zellen über die *high endothelial venules* (HEV) direkt über die Blutbahn in Lymphknoten wandern können. Es wurde gezeigt, dass humane pDZ diesen von CD62L geführten Weg nutzen, um in die HEV zu gelangen

[Cella, 1999] und dass CD62L defiziente Mäuse eine drastisch reduzierte Anzahl an pDZ in den peripheren Lymphknoten aufweisen [Nakano, 2001]. Interessanter Weise exprimieren pDZ aus peripheren Organen CD62L nicht so stark wie die FL-BM pDZ oder pDZ aus humanen bzw. murinen Blut [O'Keeffe, 2002; Cella, 1999; O'Keeffe, 2003]. Durch die starke Expression von CD62L scheinen die FL-BM pDZ ideal ausgestattet zu sein, um in die peripheren Lymphknoten zu wandern. Die unterschiedliche Expression von CD62L der pDZ aus Blut und der Kultur im Vergleich mit pDZ aus peripheren Organen könnte ein Anzeichen für unterschiedliche Aktivierungsstadien der Zellen sein, da bei der Stimulation mit den TLR-Liganden R-848 und CpG-DNA beobachtet werden konnte, dass die Expression von CD62L auf der Zelloberfläche schnell herabreguliert wird.

Durch die Stimulationsversuche mit den TLR-Liganden stellte sich als weiterer, sehr sensitiver, Aktivierungsmarker für pDZ, CD69 heraus, welcher nach Aktivierung der Zellen stark auf der Oberfläche exprimiert wird. Die signifikant hohe Expression von CD69 stellte sich als spezifisch für FL-BM pDZ und *ex vivo* isolierte pDZ heraus, da die cDZ diesen Marker nach Stimulation nicht auf ihrer Oberfläche tragen.

Da Dendritische Zellen eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von naiven T-Zellen einnehmen, wurde ebenfalls die Expression der für die Interaktion zwischen DZ und T-Zelle wichtigen kostimulatorischen Moleküle (CD40, CD54, CD80 und CD86) nach Stimulation mit TLR-Liganden untersucht. Während für CD40 und CD54 bei beiden in der Kultur generierten DZ-Subtypen eine verstärkte Expression nach Stimulation festgestellt werden konnte, erhöhte sich die Expression von CD80 und CD86 nur auf der Fraktion der cDZ. Bei den FL-BM pDZ konnte eine kleine Erhöhung der CD86 Expression detektiert werden, wenn die Stimulation länger als 24h dauerte. Dies zeigt, dass diese Zellen länger benötigen um dieses charakteristische Oberflächenmolekül der Antigen-präsentierenden Zellen zu exprimieren.

Anhand der unterschiedlich starken Reaktionen auf die einzelnen TLR-Liganden stellte sich heraus, dass die Liganden für TLR7 (R-848) und TLR9 (CpG-DNA) die potentesten Stimuli waren um eine phänotypische Aktivierung der pDZ zu induzieren. Somit scheinen auch die FL-BM pDZ in erster Linie TLR7 und TLR9 zu exprimieren. Zusätzlich konnten schwache Effekte auf die Regulierung von CD62L und CD69 beobachtet werden, wenn die FL-BM pDZ mit Liganden für TLR2-4 stimuliert wurden, dies deutete darauf hin, dass in den *in vitro* generierten pDZ diese Toll-like Rezeptoren zudem gering funktionell exprimiert werden, was ebenfalls eine Parallele mit den veröffentlichten mRNA Daten von murinen pDZ darstellt [Brawand, 2002; Edwards, 2003; Okata, 2003].

### **Stimulation mit CpG-1668, CpG-2216 und R-848 führt zu unterschiedlicher IFN- $\alpha$ Produktion**

Eine phänotypische Aktivierung der FL-BM pDZ resultierte aber nicht zwingend auch in der Produktion von IFN- $\alpha$ . Dies wird deutlich bei der Stimulation mit dem synthetischen TLR7-Ligand R-848. Während humane pDZ nach Stimulation mit dieser Substanz große Mengen an IFN- $\alpha$  produzieren [Ito, 2002] konnte bei den pDZ aus der FL-BM Kultur kaum eine Produktion an IFN- $\alpha$  nachgewiesen werden. Das gleiche überraschende Ergebnis zeigte sich bei den Stimulationen mit Typ A und Typ B CpG-ODN. Es stellte sich heraus, dass nur Typ A CpG-ODN (CpG-2216) in der Lage war bei den FL-BM pDZ die Produktion großer Mengen an IFN- $\alpha$  zu induzieren. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu der Tatsache, dass *ex vivo* isolierte pDZ aus dem Knochenmark und der Milz als Reaktion auf beide CpG-Typen große Mengen an IFN- $\alpha$  produzieren [O’Keeffe, 2002]. Für humane pDZ aus dem Blut wurde jedoch eine ganz ähnliche Reaktion auf die beiden CpG-Arten gezeigt, wie sie auch bei den FL-BM generierten pDZ zu beobachten war. So reagierten humane pDZ auf Typ A CpG-ODN ebenfalls mit der Produktion großer Mengen an IFN- $\alpha$ , wohingegen mit Typ B CpG-ODN kaum messbare IFN- $\alpha$  Werte ermitteln ließen [Krug, 2001]

Im Unterschied zu IFN- $\alpha$  induzierten beide CpG-Arten, wie auch R-848, bei den FL-BM pDZ das proinflammatorische Zytokin IL-6 in großer Menge. Auf die Stimulation mit den Liganden der Toll-like Rezeptoren 2-4 zeigten die pDZ kaum eine messbare IL-6 Produktion bei einer Stimulationsdauer von ca. 20 h. Wurde die Stimulation aber auf zwei Tage ausgedehnt, zeigte sich auch bei den FL-BM pDZ eine leichte Expression von IL-6 als Reaktion auf Pam3Cys, p(I:C) und LPS. Somit wurde deutlich, dass die Expression der TLR auf den pDZ noch durch äußere Umwelteinflüsse nach der Generierung beeinflussbar war.

Zusätzlich zeigte sich, dass die FL-BM generierten pDZ als Reaktion auf CpG-ODN in der Lage waren IL-12p70 zu produzieren. Jedoch war die Menge an produzierten IL-12p70 5-fach geringer, als die Menge, welche von den FL-BM cDZ produziert wurde.

Durch diese phänotypischen Analysen und Messung der produzierten Zytokine nach Stimulation lässt sich zusammenfassen, dass es gelungen ist mit Hilfe dieses Kultursystems den Anteil von weniger als 1% plasmazytoider DZ innerhalb der Gesamtzellen des Knochenmarks auf bis zu 60% innerhalb der Gesamtzellen der Kultur zu steigern. Somit ist dieses Kultursystem ein wichtiges Werkzeug um aus dem Knochenmark einer Maus bis zu 20 Millionen pDZ zu gewinnen. Es sei erwähnt, dass die Generierung dieser Zellen nicht vom genetischen Hintergrund der Mäuse (C57BL/6, BALB/c oder Sv129) abhängig ist. Die generierten pDZ zeigen sowohl phänotypische als auch funktionelle Gemeinsamkeiten mit *ex vivo* isolierten pDZ aus Mäusen wie aus dem Menschen. Die Daten des in dieser Arbeit etablierten Kultursystems stimmen zudem weitestgehend mit den Daten des von Gilliet *et al*,

2002 beschriebenen Kultursystems zu Generierung von pDZ überein, das ebenfalls auf der Zugabe von Flt3-L basiert.

#### **4.2. Guanosinkette am 3'Ende von CpG-2216 ist eine entscheidende Komponente für die IFN- $\alpha$ Induktion bei pDZ**

Die unterschiedliche Responsivität der FL-BM pDZ auf Typ A CpG-ODN (CpG-2216) und Typ B CpG-ODN (CpG-1668) war nicht auf die Erkennung durch unterschiedliche Rezeptoren zurückzuführen. Beide CpG-Typen wurden von den FL-BM generierten Zellen über den Rezeptor TLR9 erkannt, da bei Zellen aus TLR9 defizienten Mäusen weder eine phänotypische Aktivierung festgestellt werden konnte, noch wurden von diesen Zellen auf Stimulation mit beiden CpG-Typen Zytokine produziert. Da sich die beiden CpG-Typen stark in ihrer Struktur und Sequenz unterscheiden (palindromische Kernsequenz, Guanosin-Ketten am 3' bzw. 5' Ende, Rückgrat aus Phosphothioat- oder Phosphodiester Bindungen), war ein Ziel, die Strukturkomponente zu identifizieren, die für die Induktion großer Mengen an IFN- $\alpha$  verantwortlich ist. Durch Modifikationen der beiden CpG-Sequenzen stellte sich heraus, dass für die IFN- $\alpha$  Produktion das Anfügen von Guanosin-Ketten an den Enden der jeweiligen Kernsequenz von entscheidender Bedeutung war. Durch diese Art der Modifikation induzierte auch die Sequenz vom Typ B CpG-ODN (CpG-1668) große Mengen an IFN- $\alpha$ . Zudem stellte sich heraus, dass von den beiden Guanosin-Ketten, nur diejenige am 3'-Ende die für die IFN- $\alpha$  Produktion die Ausschlaggebende zu sein scheint, da bei ihrem Fehlen keine Zytokinproduktion nachweisbar war. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auf einen frühzeitigen Abbau des Oligonukleotids durch DNasen zurückzuführen ist. Denkbar ist aber auch, dass durch das Fehlen der 3'-Guanosin-Kette eine Tetradenbildung des Oligonukleotides verhindert wird, welches als möglicher Grund für die hohe IFN- $\alpha$  Produktion als Reaktion auf diese Art CpG-ODN diskutiert wird [Kerkmann, 2004].

Eine untergeordnete Rolle für die Produktion großer Menge an IFN- $\alpha$  scheinen ein gemischtes Rückgrat, die innere, CpG-haltige Kernsequenz und die Guanosin-Kette am 5'-Ende zu spielen.

Erstaunlicherweise lassen sich durch das Anhängen von Guanosinketten an die Enden der Oligonukleotide sogar beschriebene Spezies-Spezifitäten innerhalb des Typ B CpG-ODN aufheben, da durch diese Guanosinketten eine als human-spezifisch beschriebene Sequenz (CpG-2006) [Bauer, 2001] ebenfalls in der Lage war murine FL-BM Zellen zur Produktion großer Mengen an IFN- $\alpha$  anzuregen. Es scheint sogar so zu sein, dass die beschriebene Spezies-Spezifität von CpG-ODN ein Artefakt des Phosphothioat-Rückgrats der

verwendeten Nukleotide ist, da in jüngsten Studien keine Spezies-Spezifität festgestellt werden konnte, wenn zur Stimulation CpG-ODNs verwendet wurden, die ein natürliches Rückgrat aus Phosphodiester-Bindungen besaßen [Roberts, 2005].

### **4.3 Unterschiedliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt zu Inhibition der IFN- $\alpha$ Produktion**

Durch Analysen der produzierten mRNA der bekannten Typ I Interferon Gene von FL-BM pDZ nach 8h Stimulation mit Typ A und Typ B CpG-ODN mit der Affymetrix Genechip Technologie<sup>®</sup> konnte gezeigt werden, dass die unterschiedliche IFN- $\alpha$  Produktion als Reaktion auf beide CpG-ODN Typen schon in der unterschiedlichen Transkription der Typ I IFN Gene begründet lag. So wurden durch das CpG-ODN 2216 sämtliche Typ I IFN Gene deutlich erhöht exprimiert, wohingegen durch CpG-1668 die Transkription dieser Gene nicht erfolgte. Da nach TLR9 Stimulation die Transkription von bestimmten Genen eng mit dem aktivierten Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B verbunden ist, lag die Vermutung nahe, dass durch die beiden CpG-ODN dieser Transkriptionsfaktor ebenfalls unterschiedlich stark aktiviert wird. Diese Annahme konnte durch die indirekte Messung von aktivierten NF- $\kappa$ B mittels eines Luziferase-Assays bestätigt werden. Es zeigte sich, dass durch die Stimulation mit CpG-2216 nur eine geringe Menge an NF- $\kappa$ B aktiviert wurde, wohingegen durch CpG-1668 bereits bei geringen Konzentrationen eine große Menge an aktivierten NF- $\kappa$ B nachgewiesen werden konnte. Das gleiche Phänomen zeigte sich auch bei der Stimulation mit R-848. In diesem Falle war von den FL-BM pDZ ebenfalls keine mRNA Expression der Typ I IFN Gene nachweisbar und von Jurk *et al*, 2002 wurde bereits gezeigt, dass R-848 eine starke Aktivierung von NF- $\kappa$ B bewirkt. Als nächster Schritt wurde versucht die Aktivierung von NF- $\kappa$ B bei der Stimulation mit CpG-1668 durch Zugabe eines spezifischen Inhibitors (TPCK) zu verhindern. So sollte die Menge an aktivierten NF- $\kappa$ B so weit gesenkt werden, dass sie der Menge entsprach, die bei der Stimulation mit CpG-2216 zur Induktion von IFN- $\alpha$  führt. Leider konnte so jedoch keine IFN- $\alpha$  Produktion durch CpG-1668 erreicht werden. Die Annahme, dass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aber dennoch mit der verhinderten Expression von IFN- $\alpha$  als Reaktion auf eine Stimulation mit CpG-1668 bzw. R-848 bei den FL-BM generierten DZ zusammenhängt, konnte aber weiter gestützt werden durch die Tatsache, dass FL-BM generierte pDZ aus p50 defizienten Mäusen durch die Stimulation mit R-848 und CpG-1668 in der Lage waren große Mengen an IFN- $\alpha$  als Reaktion auf diese Stimuli zu produzieren.

Da sich der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B als Hetero- oder Homo-Dimer aus den einzelnen Mitgliedern der Rel/NF- $\kappa$ B Protein-Familie (p50, p52, RelA, RelB, und c-Rel)



zusammensetzt, konnte durch die Zellen dieser p50 KO Mäuse gezeigt werden, dass durch Ausschalten dieses NF- $\kappa$ B Proteins, die pDZ dieser KO Mäuse nicht mehr inhibitorisch auf CpG-1668 oder R848 Stimulation reagierten. Erklären lässt sich dieses Ergebnis mit den Annahmen, dass vorhandene p50 Dimere in pDZ aus Wildtyp-Mäusen selbst inhibitorisch auf die IFN- $\alpha$  Produktion wirken oder aber, dass ein p50 abhängiger Inhibitor existiert, der in den pDZ der KO Mäusen somit unwirksam ist und die IFN- $\alpha$  Produktion stattfinden kann. Die Klärung dieser Theorien ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Das es sich bei dem beobachteten Effekt tatsächlich um eine Inhibierung der IFN- $\alpha$  Produktion und nicht lediglich um eine fehlende Stimulation handelte, lässt sich durch die beobachtete Aktivierung der Zellen anhand der erhöhten Expression von kostimulatorischen Molekülen und Aktivierungsmarkern auf deren Zelloberfläche folgern. Ebenfalls gegen eine mangelnde Stimulation spricht die unbeeinträchtigte Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 nach der Stimulation mit CpG-1668 und R-848.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass diese Inhibition der IFN- $\alpha$  Produktion nach Stimulation mit CpG-1668 oder R-848 auch aktiv die IFN- $\alpha$  Produktion bei simultaner CpG-2216 Stimulation verhinderte.

Bei der gleichzeitigen Stimulation von CpG-1668 und CpG-2216 kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine gegenseitige Kompetiton um den gemeinsamen, vermuteten, DNA-Aufnahmerezeptor, bzw. im Endosom eine Rivalität um den gemeinsamen, signalgebenden Rezeptor TLR9 vorliegt. Ebenso könnte CpG-1668 besser in die Zelle aufgenommen werden und somit die CpG-2216 Stimulation geringer ausfallen, wodurch die Effekte von CpG-1668 stärker zu tragen kämen. Jedoch herrscht allgemein die Meinung vor, dass CpG-ODN des Typs A aufgrund ihrer Guanosinketten an den Enden besser in Zellen aufgenommen werden können [Gursel, 2002] als CpG-ODN des Typs B.

Den gleichen inhibitorischen Effekt auf die IFN- $\alpha$  Produktion konnte bei der simultanen Stimulation der FL-BM DZ mit CpG-2216 und R-848 beobachtet werden. In diesem Falle kann eine Konkurrenz um den gleichen Aufnahmerezeptor wie auch um den gleichen *Toll-like* Rezeptor ausgeschlossen werden, da angenommen wird, dass R-848 membrangängig ist und keinen speziellen Aufnahmerezeptor benötigt. Zudem wird der Stimulus über TLR7 erkannt wohingegen CpG-DNA mit TLR9 interagiert. Durch Versuche mit TLR7 defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese IFN- $\alpha$  Inhibition bei der simultanen Stimulation mit R-848 und CpG-2216 komplett abhängig war von der Erkennung des TLR7-Liganden R-848. FL-BM DZ aus TLR7 defizienten Mäusen reagiert mit keinerlei Einschränkung in der Produktion von IFN- $\alpha$ . Durch diese gezeigte TLR7 Abhängigkeit können alternative Mechanismen der DNA Erkennung ausgeschlossen werden.

#### 4.4 Herpes simplex Virus-1 induziert IFN- $\alpha$ Produktion über TLR9 abhängige und unabhängige Wege

Neben den Reaktionen der FL-BM generierten pDZ auf die synthetischen Liganden für TLR7 und TLR9 wurde im Zuge dieser Arbeit auch die TLR9-Abhängigkeit des natürlichen IFN- $\alpha$  Stimulus Herpes simplex Virus-1 (HSV-1) untersucht. Da HSV-1 ein doppelsträngiges DNA-Genom besitzt, bestand unsere Hypothese darin, dass HSV-1 über TLR9 von Immunzellen erkannt wird und so die beschriebene IFN- $\alpha$  Produktion nach einer HSV Infektion induziert wird.

Es zeigte sich, dass plasmazytoide DZ (CD11c<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>), die aus Knochenmarksvorläufern mit Flt3-L *in vitro* generiert wurden, die Hauptproduzenten für IFN- $\alpha$  nach der Stimulation mit dem als Positivkontrolle eingesetzten CpG-2216 waren. In den *ex vivo* isolierten Knochenmarkszellen stammte die Interferon-Antwort auf CpG-2216 ebenfalls aus CD45RA<sup>+</sup> und B220<sup>+</sup> Zellen, aber sowohl CD11c<sup>+</sup> als auch CD11c<sup>neg</sup> Zellen produzierten ebenfalls IFN- $\alpha$  auf CpG-2216. Aus den Daten von Abb. 3.20 lässt sich schließen, dass diese CD11c<sup>neg</sup>, auf Stimulation mit CpG-2216, IFN- $\alpha$  produzierenden Zellen Vorläufer der CD11c<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup> pDZ sind. Solche CD45RA<sup>+</sup> Vorläufer der pDZ, die noch nicht das gesamte Repertoire an pDZ spezifischen Markern auf ihrer Oberflächen exprimieren, aber eine große Kapazität besitzen IFN- $\alpha$  zu produzieren, wurden bereits in humanem Knochenmark identifiziert [Blom, 2000]. Sehr wahrscheinlich enthält diese CD11c<sup>neg</sup> Population aus dem murinen Knochenmark ebenfalls diese Vorläuferzellen.

Wie erwartet waren sämtliche Immunreaktionen auf CpG-2216 komplett abhängig von TLR9 und MyD88, da das Fehlen eines dieser Moleküle den vollständigen Verlust an pDZ Reifung und Zytokinproduktion zur Folge hatte.

Aber nicht nur als Antwort auf CpG-2216 produzierten die plasmazytoiden DZ viel IFN- $\alpha$ , sondern auch auf Stimulation mit HSV-1. Wie schon bei Krug *et al*, 2004 beschrieben, war die Reaktion der pDZ aus der Milz auf eine HSV-1 Infektion komplett abhängig von TLR9. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass sowohl die *ex vivo* isolierten pDZ aus dem Knochenmark als auch solche die *in vitro* aus Knochenmarks-Stammzellen generiert wurden fähig waren, auf HSV-1 mit der Produktion von IFN- $\alpha$  zu reagieren, auch wenn ihnen TLR9 oder MyD88 fehlte. Die Produktion in den „knock out“ Zellen war jedoch geringer als in den Wildtyp Zellen. Somit setzt sich die Immunantwort auf eine HSV-1 Infektion in pDZ aus dem Knochenmark sowohl aus einer TLR9 abhängigen als auch aus einer TLR9 unabhängigen Erkennung zusammen.

Als Hauptproduzenten von IFN- $\alpha$  als Immunreaktion auf HSV-1 wurden ursprünglich die pDZ vermutet, da diese Zellen auch bei *in vivo* Stimulation mit einem anderen Virus aus der Herpes-Familie (murines Cytomegalovirus; MCMV) als Quelle von IFN- $\alpha$  beschrieben

wurden [Asselin-Paturel, 2002]. Das dies für HSV-1 Stimulationen nicht der Fall ist, wurde deutlich, da *in vitro* generierte cDZ aus der FL-BM Kultur, GM-CSF generierte DZ, M-CSF generierte Makrophagen sowie *ex vivo* isolierte Knochenmarkszellen (CD11c<sup>pos</sup> CD45RA<sup>neg</sup> B220<sup>neg</sup>), die nicht den pDZ entsprachen, ebenfalls in der Lage waren IFN- $\alpha$  und andere Zytokine als Reaktion auf HSV-1 zu produzieren.

Da die Depletion der CD11c<sup>pos</sup> Zellen aus dem Knochenmark kaum die IFN- $\alpha$  Produktion als Reaktion auf HSV-1 Stimulation beeinflusste, lässt sich folgern, dass die Produktion von IFN- $\alpha$  des gesamten Knochenmarkszellen auf HSV-1 Stimulation *in vivo* nur geringfügig von pDZ abhängt, obwohl die pDZ die potentesten IFN- $\alpha$  Produzenten sind, was die Produktion pro Zelle betrifft.

Um einen besseren Einblick in die Erkennung von HSV-1 zu bekommen, wurde die Reaktion sowohl von FL-BM DZ als auch von *ex vivo* isolierten Knochenmarkszellen auf hitzeinaktivierte Viruspartikel getestet. Bei diesen Tests zeigte sich, dass sowohl die FL-BM DZ, die gesamten *ex vivo* isolierten Knochenmarkszellen wie auch die *ex vivo* isolierten, CD11c<sup>pos</sup> angereicherten Knochenmarkszellen die Fähigkeit verloren, unabhängig von TLR9, auf HSV-1 zu reagieren. Die Reaktion auf mit Hitze behandeltem HSV-1 fand somit ausschließlich über den Rezeptor TLR9 statt. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass HSV-1 über mindestens zwei unterschiedliche Signalwege erkannt wird. Ein hitzestabiler Stimulus scheint über den TLR9 abhängigen Signalweg erkannt zu werden, während ein hitzelabiler Stimulus unabhängig von TLR9 und MyD88 erkannt wird. Den hitzestabilen, TLR9 abhängigen Stimulus stellt höchstwahrscheinlich das virale, doppelsträngige DNA-Genom dar, da TLR9 als Rezeptor für bakterielle und virale DNA beschrieben wurde [Hemmi, 2000] und zudem gezeigt werden konnte, dass hohe Konzentrationen an gereinigter HSV-DNA stimulatorisch wirkt [Zheng, 2002; Lund, 2003]. Der TLR9 unabhängige Mechanismus der HSV-1 Erkennung ist nicht klar und es scheint zwei mögliche Ansatzpunkte zu geben. Einer könnte das virale Glykoprotein D sein, da gezeigt wurde, dass rekombinantes Glykoprotein D, ein wichtiges Oberflächenprotein des Virus, das den Eintritt in die Wirtszelle vermittelt, in der Lage ist humane PBMC zur Produktion von IFN- $\alpha$  anzuregen [Ankel, 1998]. Ein Protein als IFN- $\alpha$  Stimulus könnte auch die beobachtete Hitzesensitivität des TLR9 und MyD88- unabhängigen Signalweges erklären, da durch diese Behandlung möglicherweise die Interaktion von Glykoprotein D mit seinem Rezeptor auf der Oberfläche der Wirtszelle unterbunden wird. Die beobachtete, verringerte Reaktion der Zellen aus WT Mäusen auf Hitze behandelten HSV-1 lässt sich durch den Wegfall der TLR9 unabhängigen Aktivierung erklären und durch eine zusätzliche geringere TLR9 Antwort als Folge der verminderten Virusaufnahme.

Ein anderer Mechanismus der TLR9 unabhängigen IFN- $\alpha$  Produktion könnte über die Stimulation durch RNA-Zwischenprodukte, die bei der Replikation des Virus in der Wirtszelle

auftreten, vermittelt werden. Dabei kann jedoch einzelsträngige RNA ausgeschlossen werden, da die Erkennung dieses PAMPs bei Mäusen komplett abhängig ist von der Erkennung über TLR7 und somit auch von MyD88 [Heil, 2004]. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Produktion von IFN- $\alpha$  und die DZ-Aktivierung ebenfalls von MyD88 unabhängig induziert wurde. Erst vor Kurzem wurde von Diebold *et al* beschrieben, dass der synthetische Stimulus p(I:C), welcher zu dsRNA analog ist, in der Lage ist, nach der Transfektion in GM-CSF generierte DZ, die Produktion großer Mengen IFN- $\alpha$  bei diesen Zellen anzuregen. Diese Produktion scheint von der Aktivierung einer durch dsRNA aktivierten Protein Kinase (PKR) abhängig zu sein [Diebold, 2003].

Durch diese Ergebnisse lässt sich der Verlust der TLR9 unabhängigen Erkennung des hitzebehandelten HSV-1 auch so erklären, dass das inaktivierte Viruspartikel nicht mehr in der Lage ist zu replizieren und somit auch keine dafür typischen dsRNA Zwischenprodukte auftreten, um so die PKR zu aktivieren.

In Übereinstimmung mit zwei weiteren Studien über die HSV Erkennung von pDZ [Lund, 2003; Krug, 2004] konnte in dieser Arbeit somit gezeigt werden, dass pDZ das HSV-1 Virus über einen TLR9 abhängigen Mechanismus erkennen. Diese Arbeiten wurden aber ausgeweitet und es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass pDZ aus dem Knochenmark in der Lage sind HSV-1 über TLR9 unabhängige Mechanismen zu erkennen. Diese TLR9 Unabhängigkeit wurde in der Studie von Lund *et al.*, 2003 nicht beobachtet, obwohl auch dort mit Zellen aus dem Knochenmark gearbeitet wurde. Eine Erklärung hierfür kann sein, dass neben unterschiedlichen Virus-Stämmen (HSV-2) auch Viren verwendet wurden, die unfähig waren sich zu replizieren, da sie entweder UV-bestrahlt waren oder ihnen das Enzym Thymidin Kinase fehlte.

Die TLR9 unabhängige Produktion von IFN- $\alpha$  durch die pDZ, aber auch die Produktion von IFN- $\alpha$  durch eine Vielzahl anderer Zellen wie konventionelle DZ oder Makrophagen, die zahlenmäßig weit häufiger sind als die pDZ, könnte zudem erklären, warum in der Studie von Krug *et al.*, 2004 kein Unterschied zwischen Wildtyp und TLR9 defizienten Mäusen nach einer *in vivo* Infektion mit HSV-1 zu erkennen war.

## 5. Zusammenfassung

Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems zählen Makrophagen, Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) und Dendritische Zellen (DZ). Dendritische Zellen können anhand ihres Phänotyps, ihrer Herkunft und ihrer Funktion in viele verschiedene Subpopulationen unterteilt werden. Eine wichtige Subpopulation der DZ stellen die plasmazytoiden DZ dar. Plasmazytoide DZ (pDZ) können *ex vivo* aus Milz, Blut, Knochenmark oder Lymphknoten isoliert werden, wobei sie jedoch nur in einer verschwindend geringen Anzahl (0,5-1%) vorkommen.

Eine zentrale Rolle bei der Detektion von mikrobiellen Strukturen (PAMPs) nehmen innerhalb des angeborenen Immunsystems die Toll-like Rezeptoren (TLR) ein. Über die TLR können z.B. bakterielle Proteine (Flagellin: TLR5), LPS (TLR4) und bakterielle und virale Nukleinsäuren (TLR7 und TLR9) erkannt werden.

Plasmazytoide Dendritische Zellen exprimieren überwiegend TLR7 und TLR9 und besitzen die Fähigkeit, große Mengen der antiviralen Typ I Interferone (bis zu 10 pg/ Zelle) als Reaktion auf Viren, bakterielle DNA, einzelsträngige RNA oder Oligodeoxynukleotide mit CpG-Motif (CpG-ODN) zu produzieren. Durch diese Fähigkeit gelten diese Zellen als die Spezialisten bei der Abwehr viraler Infektionen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kultursystem etabliert, mit dem es möglich war, aus *ex vivo* isolierten Knochenmarkszellen, unter Zusatz von „FMS-like tyrosine kinase-3 ligand“ (Flt3-L), große Mengen an Zellen zu generieren, die phänotypisch mit frisch isolierten pDZ aus dem Knochenmark vergleichbar waren. So exprimierten sie auf ihrer Oberfläche die pDZ-Marker CD45RA, CD45R (B220) und CD11c. Kaum exprimiert wurde der charakteristische Marker für myeloide DZ, CD11b. Auch nach Stimulation mit Liganden für TLR7 (R-848) und TLR9 (CpG-DNA) glichen sie in ihren phänotypischen Änderungen, durch Regulierung von Aktivierungsmarkern (CD40, CD69, CD62-L), *ex vivo* isolierten pDZ. Des Weiteren waren die *in vitro* generierten Zellen in der Lage als Reaktion auf Stimulation mit dem TLR9 Liganden CpG-DNA, große Mengen des für pDZ typischen Zytokins IFN- $\alpha$  zu produzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass es gelungen ist aus Vorläuferzellen im Knochenmark einer Maus bis zu  $20 \times 10^6$  pDZ *in vitro* zu generieren, verglichen mit weniger als  $1 \times 10^6$  pDZ welche sich *ex vivo* aus einem Knochenmark isolieren lassen.

Die Versuche zur Induktion der IFN- $\alpha$  Produktion durch Stimulation mit TLR9 (CpG-DNA) und TLR7 (R-848) Liganden zeigten aber auch, dass eine phänotypische Aktivierung der FL-BM pDZ als Reaktion auf die Stimulation nicht zwingend mit der Produktion von IFN- $\alpha$  korreliert.

Bei den beschriebenen synthetischen Liganden für TLR9 handelt es sich um kurze DNA-Oligonukleotide die charakteristische Merkmale von bakterieller DNA aufweisen. So ist das gesamte Nukleotid unmethyliert und trägt ein oder mehrere Cytosin-Guanosin (CpG) Motife. Bis jetzt wurden zwei Haupttypen, Typ A und Typ B, an CpG-ODN Sequenzen beschrieben. Beide CpG-Arten unterscheiden sich stark in ihren Strukturen, Sequenzen und auch in ihren Effekten auf humane Immunzellen. Typ B CpG-ODN induziert nur wenig IFN- $\alpha$  Produktion, hat aber große Effekte auf die Proliferation von B-Zellen. Im Kontrast dazu induziert Typ A CpG-ODN die Produktion großer Mengen an Typ I Interferonen in plasmazytoiden DZ aus humanen Blut. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser beschriebene Unterschied bei der Induktion der IFN- $\alpha$  Produktion sich auch auf murine pDZ übertragen lässt. Ein Ziel dieser Arbeit war es daraufhin die strukturelle Komponente zu identifizieren, welche für diesen Unterschied in der IFN- $\alpha$  Produktion verantwortlich ist. Durch Modifikationen der Sequenzen konnte gezeigt werden, dass die für CpG-ODN Typ A typische Guanosin-Kette an dem 3' Ende des Oligonukleotides für die Produktion großer Mengen IFN- $\alpha$  verantwortlich ist. Von untergeordneter Rolle für die Produktion großer Mengen an IFN- $\alpha$  scheinen die Bindungen des Rückgrats, die zentrale, CpG-haltige Kernsequenz und Guanosin-Anhänge am 5' Ende des Oligonukleotides zu spielen.

Fehlende Induktion der IFN- $\alpha$  Produktion konnte neben der Stimulation mit Typ B CpG-DNA auch bei der Stimulation mit dem synthetischen TLR7 Liganden R-848 (Resiquimod) beobachtet werden. Mittels Affymetrix Genechip<sup>®</sup> Technologie wurde deutlich, dass die fehlende Zytokinproduktion durch eine fehlende Expression der Typ I Interferon Gene begründet ist. Einen Hinweis welche Komponente auf der transkriptionellen Eben für diese verhinderte Produktion von IFN- $\alpha$  verantwortlich sein könnte, lieferten *in vitro* generierten pDZ aus p50 *knock out* Mäusen. Diesen Zellen fehlt ein Protein der NF- $\kappa$ B/Rel Familie, aus denen sich der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B als Dimer zusammensetzt. Diese Zellen der p50 defizienten Mäuse reagierten uneingeschränkt mit der Produktion großer Mengen an IFN- $\alpha$  bei der Stimulation mit R-848 und CpG-Typ B. Somit scheint klar zu sein, dass entweder ein p50 abhängiger Transkriptions-Inhibitor der IFN- $\alpha$  Gene existiert, oder dass p50 Dimere selbst inhibitorisch auf die Zytokinproduktion als Reaktion auf diese Stimuli wirken.

Neben bakterieller DNA können plasmazytoide DZ auch durch virale Infektionen zur Produktion großer Mengen an Typ I Interferonen angeregt werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin zu klären, ob virale DNA ebenfalls ein natürlicher Ligand für TLR9 darstellt. Als Modell-Virus wurde Herpes simplex Virus 1 (HSV-1) verwendet, dessen Genom aus einer doppelsträngigen DNA besteht.

Mit Hilfe von TLR9 *knock out* Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich die Immunantwort auf HSV-1 von FL-BM generierten pDZ aus einer TLR9 abhängigen und TLR9-unabhängigen Komponente zusammensetzt. Diese TLR9 unabhängige IFN- $\alpha$  Produktion war ebenfalls bei *ex vivo* isolierten pDZ aus dem Knochenmark nachweisbar. Durch Hitzebehandlung des HSV-1 konnte diese TLR9 unabhängige Immunantwort komplett aufgehoben werden. Dieses hitzebehandelte Virus war nur noch in der Lage über TLR9 und somit über sein Genom eine Immunantwort auszulösen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass neben den als Hauptproduzenten beschrieben pDZ, auch eine Reihe anderer Zelltypen in der Lage sind, vergleichbare, absolute Mengen an IFN- $\alpha$  als Reaktion auf eine Virusinfektion zu produzieren. Dazu zählen konventionelle DZ (cDZ) oder Makrophagen aus dem Knochenmark. Zudem ist diese IFN- $\alpha$  Produktion von Makrophagen und cDZ weitestgehend TLR9 unabhängig. Somit sind sowohl pDZ als auch cDZ und Makrophagen in TLR9 abhängiger und unabhängiger Weise für eine Immunantwort des angeborenen Immunsystems gegen Viren wichtig.





## 6. Literaturverzeichnis

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

Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* **4**: 499-511

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

Alexopoulou, L., Thomas, V., Schnare, M., Lobet, Y., Anguita, J., Schoen, R.T., Medzhitov, R., Fikrig, E. and Flavell, R.A. (2002) Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nature Med* **8**: 878-884

Ankel, H., Westra, D., Welling-Wester, S. and Lebon, P. (1998) Induction of interferon-alpha by glycoprotein D of herpes simplex virus: a possible role of chemokine receptors. *Virology* **251**: 317-326

Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambyuant, 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

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

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

Barchet, W., Cella, M., Odermatt, B., Asselin-Paturel, C., Colonna, M. and Kalinke U. (2002) Virus-induced Interferon- $\alpha$  Production by a Dendritic Cell Subset in the Absence of Feedback Signaling In Vivo. *J Exp Med* **195**: 507-516

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

- 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 USA* **98**: 9237-9242
- Beutler, B. and Rietschel, E.T. (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* **3**: 169-176
- Bird, A.P. (1986) CpG-rich Islands and the Function of DNA Methylation. *Nature* **321**: 209-213
- Biron, C. (2001) Interferons  $\alpha$  and  $\beta$  as immune regulators – A new look. *Immunity* **14**: 661-664
- Bjorck, P. (2001) Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* **98**: 3520-3526
- Blom, B., Ho, S., Antonenko, S. and Liu, Y.J. (2000) Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (pre-DC) 2 from human CD34+ hematopoietic stem. *J Exp Med* **192**: 1785-1796
- Blom, B., Ligthart, S.J., Schotte, R. and Spits H. (2002) Developmental origin of pre-DC2. *Hum Immunol* **63**: 1072-1080
- Brawand, P., Fitzpatrick, D.R., Greenfield, B.W., Brasel, K., Maliszewski, C.R. and De Smedt, T. (2002) Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J Immunol* **169**:6711–6719
- Brocker, T., Riedinger, M. and Karjalainen, K. (1997) Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes *in vivo*. *J Exp Med* **185**: 541-550
- Carbone, F.R. and Heath W.R. (2003) The role of dendritic cell subsets in immunity to viruses. *Curr Opin Immunol* **15**: 416-420

Cederblad, B. and Alm, G.V. (1991) Interferons and the colony-stimulating factors IL-3 and GM-CSF enhance the IFN-alpha response in human blood leucocytes induced by herpes simplex virus. *Scand J Immunol* **34**: 549-555

Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A. and Colonna, M. (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* **5**: 919-923

Chu, W., Gong, X., Li, Z., Takabayashi, K., Ouyang, H., Chen, Y., Lois, A., Chen, D.J., Li, G.C., Karin, M., and Raz, E. (2000) DNA-PKcs is required for activation of innate immunity by immunostimulatory DNA. *Cell* **103**:909–918

Coley, W.B. (1893) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* **105**: 487-511

Colonna, M., Trinchieri, G. and Liu, Y.J. (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5**:1219-1226

Cousens, L.P., Orange, J.S., Su, H.C. and Biron, C.A. (1997) Interferon alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 634-639

Dalod, M., Salazar-Mather, T., Malmgaard, L., Lewis, C., Asselin-Paturel, C., Brière, F., Trinchieri, G. and Biron, C.A. (2002) Interferon  $\alpha/\beta$  and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med* **195**: 517-528

del Hoyo, G.M., Marín, P., Vargas, H.H., Ruiz, S., Fernández, A. and Ardavin, C. (2002) Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* **415**: 1043-1047

Diebold, S.S., Montoya, M., Unger, H., Alexopoulou, L., Roy, P., Haswell, L.E., Al-Shamkhani, A., Flavell, R., Borrow, P. and Reis e Sousa, C. (2003) Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* **424**: 324-328

Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. and Reis e Sousa, C. (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**: 1529-1531

Doyle, S., Vaidya, S., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P., Wu, T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M., Modlin, R. and Cheng, G. (2002) IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* **3**: 251-263

Edward, A.D., Diebold, S.S., Slack, E.M., Tomizawa, H., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S. and Reis e Sousa, C. (2003) Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol* **33**: 827-833

Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P. and Harte, M.T. (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Nature* **413**: 78-83

Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M. and Golenbock, D.T. (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* **198**: 1043-1055

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

Galibert, L., Maliszewski, C.R. and Vandenabeele, S. (2001) Plasmacytoid monocytes /T-cells: a dendritic cell lineage? *Semin Immunol* **13**: 283-289

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

Grouard, G., Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Bancherau and J., Liu, Y.J. (1997) The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with Interleukin [IL]-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* **185**: 1101-1111

Grumont, R., Hochrein, H., O'Keeffe, M., Gugasyan, R., White, C., Caminschi, I., Cook, W. and Gerondakis, S. (2001) c-Rel regulates interleukin 12p70 expression in CD8<sup>+</sup> dendritic cells by specifically inducing p35 gene transcription. *J Exp Med* **194**: 1021-1031

Gursel, M., Verthelyi, D., Gursel, I., Ishii, K.J. and Klinman, D.M. (2002) Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J Leukoc Biol* **71**: 813-820

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**: 1099-10103.

Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H. and Bauer, S. (2003) The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* **33**: 2987-2997

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. and Bauer, S. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**: 1529-1531

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K. and Akira, S. (2003) The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol* **170**: 3059-3064

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, s., Sanjo, H., Matusmoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**: 740-745

Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E. and Shortman K. (2001) The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* **167**: 741-748

- Hochrein, H., O'Keeffe, M. and Wagner H. (2002) Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* **63**: 1103-1110
- Hochrein, H., O'Keeffe, M., Luft, T., Vandenabeele, S., Grumont, R.J., Maraskovsky, E. and Shortman, K. (2000) IL-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J Exp Med* **192**: 823-833
- Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P. and O'Keeffe, M. (2001) Differential production of IL-12, IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* **166**:5448-5455
- Hohino, 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
- Hornig, T., Barton, G.M. and Medzhitov, R. (2001) TIRAP: an adaptor molecule in the Toll signalling pathway. *Nat Immunol* **2**: 835-841
- Hornig, T., Barton, G.M., Flavell, R.A. and Medzhitov, R. (2002) The adaptor molecule TIRAP provides signaling specificity for Toll-like receptors. *Nature* **420**: 329-333
- 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
- Isaacs, A. and Lindemann, J. (1957) Virus interference: I The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**:258-67
- Ishii, K.J., Takeshita, F., Gursel, I., Gursel, M., Conover, J., Nussenzweig, A. and Klinman, D.M. (2002) Potential Role of Phosphatidylinositol 3 Kinase, rather than DNA-dependent Protein Kinase, in CpG DNA-induced Immune Activation. *J Exp Med* **196**: 269-274
- 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

Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Ikehara, S., Inaba, K. and Fukuhara S. (2001) Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J Immunol* **166**: 2961-2969

Jacobs, B.L. and Langland J.O. (1996) When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* **219**: 339-349

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

Janeway Jr., C.A. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216

Janeway, C. und Travers, P. (1997) Immunologie *Spektrum Akademischer Verlag*, 2. Auflage

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

Kadowaki, N. and Liu, Y.J. (2002) Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* **63**: 1126-1132

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

Karsunky, H., Merad, M., Mende, I., Manz, M.G., Engleman, E.G. and Weissman, I.L. (2005) Developmental origin of interferon-alpha-producing dendritic cells from hematopoietic precursors. *Exp Hematol* **33**:173-181

Karupiah, G., Xie, Q.W., Buller, R.M., Nathan, C., Duarte, C. and MacMicking, J.D. (1993) Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* **261**: 1445-1448

- Katze, M. G., He, Y. and Gale, M. Jr. (2002) Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* **2**: 675-87
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**: 115-122
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Mühlradt, P.F., Sato, S., Hoshino, K. and Akira, S. (2001) Lipopolysaccharide stimulates in the MyD88-independent pathway and results in activation of IRF-3 and the expression of a subset of LPS-inducible genes. *J Immunol* **167**: 5887-5894
- Kerkmann, M., Costa, L.T., Richter, C., Rothenfusser, S., Battiany, J., Hornung, V., Johnson, J., Englert, S., Ketterer, T., Heckl, W., Thalhammer, S., Endres, S. and Hartmann, G. (2004) Spontaneous formation of nucleic-acid based nanoparticles is responsible for high IFN- $\alpha$  induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells. *J Biol Chem* **280**: 8086-8093
- Kerkmann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S. and Harmann G. (2003) Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of Type I IFN synthesis in human plasmacytoid Dendritic cells. *J Immunol* **170**: 4465-4474
- Kodukula, P., Liu, T., Rooijen, N.V., Jager, M.J. and Hendricks, R.L. (1999) Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J Immunol* **162**: 2895-2905
- Krieg, A.M., Yi, A., 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
- Krieg, A.M. (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* **20**: 709-760
- Krieg, A M., 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., Luker, G.D., Barchet, W., Leib, D.A., Akira, S. and Colonna, M. (2004) Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* **103**: 1433-1437

Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdörfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z.K., Endres, S., Krieg, A.M. and Hartmann G. (2001) Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- $\alpha/\beta$  in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**: 2154-2163

Krug, A., Veeraswamy, R., Pekosz, A., Kanagawa, O., Unanue, E.R., Colonna, M. and Cella, M. (2003) Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *J Exp Med* **197**: 899-906

Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R. Giese, T., Engelmann, H., Endres, S. Krieg, A.M. and Hartmann, G. (2001) Toll-like receptors 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

Kuby (2000) Immunology *W. H. Freeman and company, New York*, 4<sup>th</sup> edition

Le Bon, A. and Tough D. (2002) Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* **14**: 432-436

Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F. and Tough, D.F. (2001) Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* **14**: 461-470

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichart, 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

Levy, D.E. and Garcia-Sastre, A. (2001) The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**:143-156

Liu, Y.J. (2001) Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**: 259-262

- Lo, D., Feng, L., Cason, M. J., Crowley, M., Pauza, M., Nguyen, A. und Reilly, C. R. (1999) Integrating Innate and Adaptive Immunity in the Whole Animal. *Immunol Rev* **169**: 225-239
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. and Iwasaki, A. (2003) Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **198**: 513-520
- Marie, I., Durbin, J.E. and Levy, D.E (1998) Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* **17**:6660-6669
- Marrack, P. Kappler, J and Mitchell, T. (1999) Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* **189**: 521-530
- Martín P., del Hoyo, G.M., Anjuère, F., Arias, C.F., Vargas, H.H., Fernández-L., Parrillas, V. and Ardavín C. (2002) Characterization of a new subpopulation of mouse CD8 $\alpha^+$  B220 $^+$  dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* **100**: 383-390
- Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A. and Seya, T. (2003) Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* **171**: 3154-3162
- McRae, B.L., Semnani, R.T., Hayes, M.P. and van Seventer, G.A (1998) Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *J Immunol* **160**:4298-4304
- Medzhitov, R. and Janeway Jr., C.A. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**: 4-9
- Medzhitov, R. and Janeway Jr., C.A. (2000a) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* **173**:89-97
- Medzhitov, R. and Janeway Jr., C.A. (2000b) Innate immunity. *N Engl J Med* **343**: 338-334
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway Jr., C.A., (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**: 394-397

Mellman, I. and Steinman, R.M. (2001) Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**: 255-258

Michal, G. (1999) *Biochemical Pathways Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin*

Milone, M.C. and Fitzgerald-Bocarsly, P. (1998) The mannose receptor mediates induction of IFN- $\alpha$  in peripheral blood dendritic cells by enveloped RNA and DNA viruses. *J Immunol* **161**: 2391-2399

Modrow, S. und Falke, D. (1998) *Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin*

Nakano, H., Yanagita, M. and Gunn, M.D. (2001) CD11c<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **194**: 1171-1178

Nikolic, T., Dingjan, G.M., Leenen, P.J. and Hendriks, R.W. (2002) A subfraction of B220<sup>+</sup> cells in murine bone marrow and spleen does not belong to the B cell lineage but has dendritic cell characteristics. *Eur J Immunol* **32**: 686-692

O'Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Caminisch, I., Miller, J.L., Anders, E.M., Wu, L., Lahoud, M.H., Henri, S., Scott, B., Hertzog, P., Tatarczch, L. and Shortman, K. (2002) Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J Exp Med* **196**: 1307-1319

O'Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., Tatarczuch, L. and Shortman, K. (2003) Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c<sup>+</sup> DC1 precursors. *Blood* **101**:1453-1459

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

Okada, T., Lian, Z.X., Naiki, M., Ansari, A.A., Ikehara, S. and Gershwin, M.E. (2003) Murine thymic plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **33**:1012-1019

Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P.A., Carballido, J., Picker, L.J. and Lund-Johansen, F. (1997) Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12551-12556

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

Pestka, S., Krause, C.D., Sarkar, D., Walter, M.R, Shi, Y. and Fisher, P.B. (2004) Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* **22**: 929-979

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* **282**:2085-2088

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Aljeos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton, B. and Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H /HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* **282**:2085-2088

Pulendran, B., Banchereau, J., Burkeholder, S., Kraus, E., Guinet, E., Chalouni, C., Caron, D., Maliszewski, C, Davoust, J., Fay, J. and Palucka, K. (2000) Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets *in vivo*. *J Immunol* **165**: 566-572

Roberts, T., Sweet, M.J., Hume, D.A. and Stacey, K.J. (2005) Cutting edge: Species-specific TLR9-mediated recognition of CpG and non-CpG phosphorothioate-modified oligonucleotides. *J Immunol* **174**: 605-608

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 USA*. **95**: 588-593

Rothenfusser, S., Tuma, E., Endres, S. and Hartmann, G. (2002) Plasmacytoid dendritic cells: The key to CpG. *Hum Immunol* **63**: 1111-1119

- Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Lippa, P., Lipford, G.B., Wagner, H. and Bauer, S. (2004) Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* **34**:2541-2550
- Sato, M., Tanaka, N., Hata, N., Oda, E. and Taniguchi, T. (1998) Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus induced activation of the IFN-beta gene. *FEBS Lett* **425**:112-116
- Shortman, K. and Liu, Y.J. (2002) Mouse and human dendritic cell subsets. *Nat Rev Immunol* **2**: 151-161
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. and Liu, Y.J. (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**: 1835-1837
- 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
- Steinman, R.M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**: 271-296
- Steinman, R.M. and Cohn, Z.A. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**: 1142-1162
- Sweet, M.J., Campbell, C.C., Sester, D.P., Xu, D., McDonald, R.C., Stacey, K.J., Hume, D.A. and Liew, F.Y. (2002) Colony-stimulating factor-1 suppresses responses to CpG DNA and expression of toll-like receptor 9 but enhances responses to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J Immunol* **168**: 392-399
- Takauji, R., Iho, S., Takatsuka, H., Yamamoto, S., Takahashi, T., Kitagawa, H., Iwasaki, H., Iida, R., Yokochi, T. and Matsuki, T. (2002) CpG-DNA-induced IFN-alpha production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors. *J Leukoc Biol* **72**: 1011-1019
- Takeda, K. and Akira, S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**:1-14

- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**: 335-376
- Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P.F. and Akira, S. (2000) Cutting edge: Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptidomacrophage-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., 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., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L. and Akira S. (2002) Role of TLR1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**: 10-14
- Taniguchi, T. and Takaoka, A. (2002) The interferon- $\alpha/\beta$  system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol* **14**: 111-116
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. and Tanaka, N. (2001) IRF family of transcription factors as regulators of host defence. *Annu Rev Immunol* **19**: 623-655
- Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo T, 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**: 955-62
- Trinchieri, G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **3**: 133-146
- Verthelyi, D. and Klinman, D.M. (2003) Immunoregulatory activity of CpG oligonucleotides in humans and nonhuman primates. *Clin Immunol* **109**:64-71
- 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

Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F., Wu, L. and Shortman, K. (1992) The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* **176**: 47-58

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. and Akira, S. (2002) Essential role of TRAP/Mal for activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* **420**: 324-329

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K. and Akira, S. (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* **4**: 1144-1150

Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Takeuchi, O., Hoshino, K., Takeda, K. and Akira, S. (2002) Cutting Edge: A novel Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor that preferentially activates the IFN- $\beta$  promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **169**: 6668-6672

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

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 and Augment IFN-Mediated Natural Killer Activity. *J Immunol* **148**: 4072-4076

Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A. and Gosh, S. (2004) A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**: 1522-1526

Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough D.F. and Sprent, J. (1998) Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8<sup>+</sup> T cells in vivo by IL-15. *Immunity* **8**: 591-599

Zheng, M., Klinman, D., Gierynska, M. and Rouse, B. (2002) DNA containing CpG motifs induces angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 8944-8999

## Eigene Publikationen und Posterpräsentationen

### Publikationen

**Schlatter B\***, Hochrein H\*, O’Keeffe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M, Bauer S, Suter M and Wagner H (2004); Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(31):11416-21

Yasuada K, Yu P, Kirschning C J, **Schlatter B**, Schmitz F, Heit A, Bauer S, Hochrein H\* and Wagner H\* (2004); Endosomal translocation allows non-CpG-DNA motifs within vertebrate DNA to activate Dendritic Cells via Toll like receptor 9 dependent and independent pathways  
Accepted *J Immunol*

\*= these authors contributed equally

### Kongresse

- |         |   |
|---------|---|
| 09/2002 | Bamberg<br>7th International Symposium on Dendritic Cells<br>Posterpräsentation:<br><i>Effects of cytokines on the production of IL-12p70 and IFN-alpha by dendritic cells derived from culture of mouse bone marrow cells with Flt3-Ligand</i>       |
| 07/2004 | Montreal /Kanada<br>12th International Congress of Immunology<br>Posterpräsentation:<br><i>Murine Dendritic Cells recognize Herpes Simplex Virus-1 via Toll-like Receptor 9 dependent and independent pathways</i>                                    |
| 10/2004 | Maastricht /Niederlande<br>Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Immunology<br>Posterpräsentation:<br><i>Murine Dendritic Cells recognize Herpes Simplex Virus-1 via Toll-like Receptor 9 dependent and independent pathways</i> |



## Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Wagner für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Bei Herrn Prof. Dr. S. Scherer möchte ich mich für die freundliche Bereitschaft diese Arbeit zu betreuen bedanken.

Bei Dr. H. Hochrein und PD Dr. S. Bauer möchte ich mich für stets offene Ohren in allen Fragen des wissenschaftlichen Arbeitens, unermüdliche Diskussionsbereitschaft und äußerst kompetente Betreuung bedanken.

Für die außergewöhnliche, freundschaftliche Laborgemeinschaft möchte ich mich ganz herzlich bei allen Troger-32-Mitgliedern bedanken: Mark, Steffi P., Tanja, Doris, Heili, Nelly, Svetlana, Thomas, Steffi K., Christine, Franzi und Tobi.  
Der 15 Uhr-Kaffee bleibt unvergessen!

Ich danke unseren wissenschaftlichen Kooperationspartnern, insbesondere

Dr. M. O’Keeffe und Dr. S. Gerondakis (WEHI, Melbourne, Australien) für die freundliche Bereitstellung des Flt3-L und der Rel/NF- $\kappa$ B KO Mäuse.

Prof. M. Suter (Universität Zürich, Schweiz) für die freundliche Bereitstellung des Herpes simplex Virus-1.

Dr. R. Lang und Dr. Jörg Mages (TU-München) für die Zusammenarbeit mit dem Affymetrix Genechip<sup>®</sup> System.

Christian, Sandie, und Babsi möchte ich herzlich für die Zeit danken, die sie in den letzten Jahren auf mich verzichten mussten.

Spatz, ohne Dich gäbe es diese Arbeit nicht! Danke für Deine nie enden wollende Geduld.

Der letzte und ♥-lichste Dank geht an die wichtigsten Menschen: meinen Eltern. Danke, für Eure unerschöpfliche Unterstützung, Vertrauen und Liebe!

## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Beatrix Schlatter  
Geburtsdatum: 27.07.1974  
Geburtsort: Tegernsee  
Familienstand: ledig

### HOCHSCHULAUSSCHULUNG

10/2001-03/2005: **Promotion:** Dr. rer. nat. am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München; Prof. Dr. H. Wagner

Thema:

*Charakterisierung der Aktivierung von murinen plasmazytoiden Dendritischen Zellen nach Stimulation mit CpG-DNA, Resiquimod (R-848) und Herpes simplex Virus-1*

10/1995 - 05/2001: **Studium:** Biologie an der Technischen Universität München

Hauptfach: Mikrobiologie  
Nebenfächer: Biochemie und Zellbiologie  
Medizinische Virologie

Diplomarbeit: Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München, Prof. Dr. K.-H. Schleifer

Thema:

*Untersuchungen zur Klonierung großer DNS-Fragmente aus Kläranlagen*

Abschluss: Diplom

### SCHULAUSSCHULUNG

09/1985 - 06/1995: Gymnasium Tegernsee  
Abschluss: Abitur

Starnberg, 23.03.05

Beatrix Schlatter