

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

Einfluss von CpG-DNA
auf die Verteilung von Zellen des Immunsystems

Günther Michael Edenharter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation:

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

Die Dissertation wurde am 25.08.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.12.2005 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG **8**

1.1	DAS IMMUNSYSTEM.....	8
1.2	DNA – MEHR ALS EIN INFORMATIONSSPEICHER	9
1.3	DAS CPG-PRINZIP	10
1.4	WIRKUNGEN VON CPG-DNA AUF DAS IMMUNSYSTEM	11
1.5	EINFLÜSSE VON CHEMOKINEN AUF DIE VERTEILUNG VON LEUKOZYTEN.....	12
1.6	VERTEILUNG UND KINETIK VON GRANULOZYTEN	13
1.7	IMMUNPROTEKTIVE EFFEKTE VON CPG-DNA.....	13

2 FRAGESTELLUNG **15**

3 MATERIAL UND METHODEN **16**

3.1	MÄUSE	16
3.2	REAGENZIEN.....	16
3.2.1	AMMONIUMCHLORID-LÖSUNG	16
3.2.2	EOSIN-FÄRBE LÖSUNG	16
3.2.3	PARAFORMALDEHYD – FIXIERLÖSUNG.....	17
3.2.4	PHOSPHAT GEPUFFERTE SALZLÖSUNG.....	17
3.2.5	5 x DNASE-I-PUFFER.....	17
3.2.6	OLIGODEOXYNUKLEOTIDE (ODN)	17
3.2.7	ANTIKÖRPER	18
3.3	METHODEN	18
3.3.1	INJEKTIONEN	18
3.3.2	BLUTGEWINNUNG.....	19
3.3.3	BLUTZELLZÄHLUNG UND ANALYSE	19

3.3.4	PRÄPARATION VON LYMPHKNOTEN - UND MILZZELLEN	19
3.3.5	MESSUNG DER EXPRESSION VON OBERFLÄCHENANTIGENEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)	20
3.3.6	REVERSE TRANSKRIPTASE POLYMERASEKETTENREAKTION (RT-PCR)	21
3.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG	25

4 ERGEBNISSE 26

4.1	EFFEKTE VON CpG-DNA AUF BLUTZELLEN	26
4.1.1	EINFLÜSSE AUF LEUKOZYTEN	26
4.1.1.1	EFFEKTE AUF DIE LEUKOZYTENZAHL	26
4.1.1.2	EFFEKTE AUF LYMPHOZYTEN UND GRANULOZYTEN	29
4.1.1.2.1	Effekte auf Lymphozyten	30
4.1.1.2.2	Effekte auf Granulozyten	31
4.1.1.3	AUSWIRKUNGEN AUF CD3 ⁺ - UND B220 ⁺ -ZELLEN	34
4.1.1.3.1	Auswirkungen auf die Zellzahl	34
4.1.1.3.2	Auswirkungen auf die Oberflächenmarker.....	35
4.1.1.4	AUSWIRKUNGEN AUF DIE MAC1- UND GR1-POSITIVEN ZELLEN.....	37
4.1.1.4.1	Auswirkungen auf die Zellzahl	37
4.1.1.4.2	Auswirkungen auf die Oberflächenmarker.....	38
4.1.2	EINFLÜSSE AUF THROMBOZYTEN	39
4.1.2.1	EFFEKTE AUF DIE THROMBOZYTENZAHL	40
4.1.2.2	EFFEKTE AUF DIE THROMBOZYTENZAHL IN TNFR(p55) ^{-/-} - MÄUSEN.....	41
4.2	EFFEKTE DER CpG-DNA AUF LYMPHKNOTEN.....	44
4.2.1	AUSWIRKUNGEN AUF DIE PERIPHEREN NICHT DRAINIERENDEN LYMPHKNOTEN	44
4.2.1.1	EFFEKTE AUF DIE ZELLZAHL.....	44
4.2.1.2	AUSWIRKUNGEN AUF LYMPHOZYTENSUBPOPULATIONEN	46
4.2.2	AUSWIRKUNGEN AUF DIE DRAINIERENDEN LYMPHKNOTEN	50
4.2.2.1	EFFEKTE AUF DIE ZELLZAHL.....	50
4.2.2.2	AUSWIRKUNGEN AUF LYMPHOZYTENSUBPOPULATIONEN	52
4.3	EFFEKTE VON CpG-DNA AUF DIE MILZ.....	53
4.3.1	AUSWIRKUNGEN AUF DAS MILZGEWICHT	53

4.3.2	EFFEKTE AUF DIE ZELLZAHL IN DER MILZ.....	54
4.3.3	EFFEKTE AUF LEUKOZYTENSUBPOPULATIONEN IN DER MILZ.....	56
4.4	EINFLUSS VON CpG-DNA AUF DIE EXPRESSION VON CHEMOKINEN.....	59
4.4.1	EINFLUSS AUF DIE SDF-EXPRESSION	59
4.4.1.1	SDF-EXPRESSION IN DER MILZ	60
4.4.1.2	SDF-EXPRESSION IM PERIPHEREN LYMPHKNOTEN	60
4.4.2	EINFLUSS AUF DIE ELC-EXPRESSION	61
4.4.2.1	ELC-EXPRESSION IN DER MILZ	61
4.4.2.2	ELC-EXPRESSION IN DEN PERIPHEREN LYMPHKNOTEN	62

5 DISKUSSION **63**

5.1	CpG-DNA FÜHRT ZU EINER TRANSIENTEN LEUKOPENIE IM BLUT	63
5.2	CpG-DNA FÜHRT ZU VERGRÖßERUNG VON LYMPHKNOTEN UND MILZ.....	65
5.2.1	WIRKUNGEN AUF DIE LYMPHKNOTEN	65
5.2.2	WIRKUNGEN AUF DIE MILZ	66
5.3	EINFLUSS VON CHEMOKINEN AUF DIE VERTEILUNG VON LEUKOZYTEN.....	67
5.4	CpG-DNA BEWIRKT EINE TRANSIENTE TNFα-ABHÄNGIGE THROMBOZYTOPENIE IM BLUT	67
5.5	VERÄNDERUNGEN IM BLUT SIND UNABHÄNGIG VOM APPLIKATIONSWEG DER CpG-DNA	68
5.6	DIE WIRKUNGEN DER CpG-DNA SIND SEQUENZSPECIFISCH.....	68
5.7	MÖGLICHE PATHOLOGISCHE EFFEKTE DER CpG-DNA	69

6 ZUSAMMENFASSUNG **71**

Abkürzungen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
APZ	Antigen präsentierende Zelle/Zellen
BSA	Bovines Serumalbumin
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CD	Cluster of Differentiation Antigen
CpG	Cytosin-Guanosin
CT	Threshold Cycle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELC	EBV-induced Gene 1 Ligand Chemokine
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FS	Forward Scatter
G-CSF	Granulozytenkoloniestimulierender Faktor
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	Mean Fluorescence Intensity
mRNA	Messenger RNA
NFκB	Nuclear Factor κ-B
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
PAMP	Pathogenassoziierte molekulare Muster („pathogen-associated molecular patterns“)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase-chain-reaction)

PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PRR	Pattern Recognition Rezeptor
rt-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RT	Raumtemperatur
SDF	Stromalcell Derived Factor
SLC	Secondary Lymphoid Tissue Chemokine
SS	Sideward Scatter
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
ZTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt

1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

Das Überleben eines Organismus hängt zu einem großen Teil davon ab, ob es ihm gelingt, unterschiedlichste Krankheitserreger am Eintritt in den Organismus zu hindern und falls dies nicht geschieht, sie wirksam zu bekämpfen. Die Mechanismen, Zellen und Moleküle, die hierfür verantwortlich sind, werden zu dem Begriff Immunsystem zusammengefasst.

Es setzt sich aus zwei Komponenten, dem angeborenen und dem adaptiven Zweig zusammen. Beide unterscheiden sich voneinander, jedoch ist eine absolute Grenzziehung zwischen ihnen nicht möglich, da sie ineinander übergehen und auf verschiedenen Bereichen interagieren.

Das angeborene Immunsystem stellt eine erste Verteidigungslinie im Kampf gegen verschiedenste Erreger dar und spielt eine wichtige Rolle in der Induktion einer spezifischen Antwort durch das adaptive System.

Das angeborene Immunsystem setzt sich aus mehreren Bestandteilen zusammen.

Haut, Epithelien und deren antimikrobielle Substanzen bilden zuerst eine physikalische und chemische Barriere. Im weiteren Verlauf spielen humorale Faktoren eine große Rolle. Hierbei handelt es sich um Akut-Phase Proteine, das Komplementsystem, Lysozym und weitere unspezifische Entzündungsmediatoren. Zum Dritten besteht es aus zellulären Bestandteilen. Zu diesen gehören Makrophagen, NK-Zellen und polymorphkernige Granulozyten.

An diese initiale Phase der Abwehr schließt sich die adaptive Immunantwort an. Sie ist spezifisch gegen einzelne Krankheitserreger gerichtet und vermittelt durch Anpassungsmechanismen eine individualisierte Antwort auf einen Erreger. Diese ist durch eine klonale Selektion gekennzeichnet. Hierunter versteht man die Tatsache, dass jene Zellen proliferieren, die spezifisch auf ein Antigen reagieren. Darüber hinaus besitzt es die Fähigkeit sich bei wiederholter Exposition auf ein Antigen an dieses zu erinnern und somit eine schnellere und verstärkte Antwort zu generieren. Dieses Phänomen wird als immunologisches Gedächtnis bezeichnet. Die Komponenten des adaptiven Immunsystems sind die B- und T-Lymphozyten. T-Lymphozyten sind für die zelluläre Abwehr verantwortlich, während B-Lymphozyten nach Differenzierung in Plasmazellen große Mengen an spezifischen Antikörpern sezernieren.

1.2 DNA – mehr als ein Informationsspeicher

1928 entdeckte Griffith, dass die Weitergabe genetischer Information von Bakterium zu Bakterium über Nukleinsäuren geschieht. Es handelt sich dabei um einen Bauplan, der die Informationen über den Aufbau eines Tochterorganismus enthält. Mit seinen Transformationsversuchen lieferte Avery 1944 den Beweis für die Bedeutung der Desoxyribonukleinsäure als genetisches Material.

9 Jahre später konnten Watson und Crick über Röntgenstrukturanalysen den Aufbau der DNA erklären (Watson und Crick, 1953).

In den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts fanden Rotem, Jensen und Isaacs erste Hinweise, dass DNA neben ihrer Funktion als Informationsspeicher auch Einflüsse auf das Immunsystem hat (Rotem et al., 1963; Jensen et al., 1963; Isaacs et al., 1966). Jedoch dauerte es bis 1984, bis Tokunaga und Mitarbeiter zeigen konnten, dass DNA immunologisch relevante Effekte bewirkt. In ihrer Arbeit zeigten sie, dass nur die DNA-Fraktion von Bacillus-Calmette-Guerin in vivo Anti-Tumor Effekte aufweist, da dieser Effekt durch Vorinkubation mit DNAsen zerstört werden konnte. RNAsen zeigten keinen Einfluss auf die Wirkung (Tokunaga et al., 1984). Anfang der neunziger Jahre beobachtete Messina, dass bakterielle DNA und nicht Vertebraten-DNA eine immunologische Antwort auslöst (Messina et al., 1991). Somit stellte sich die Frage, welche Strukturen der DNA hierfür verantwortlich sind. Tokunaga und Yamamoto konnten diese Frage durch Herstellung synthetischer DNA klären. Über Sequenzvergleiche erarbeiteten sie Oligonukleotide, die aus einem zentralen Palindrom mit einem CG-Dinukleotid (CpG-Motiv) bestehen. Sie konnten weiterhin zeigen, dass es hierbei zu einer Aktivierung von NK-Zellen über Produktion von Interferonen kommt (Tokunaga et al., 1992). Eine genauere Charakterisierung dieser für die immunologischen Reaktionen wichtigen Strukturen gelang Krieg. Er veränderte gezielt die Sequenz der DNA und beschrieb sodann ein sechsbasiges Motiv. Zentrales Element darin ist ein CpG-Motiv, das für die immunologische Aktivität verantwortlich ist. Krieg beschrieb in dieser Arbeit somit eine Sequenz, die sich aus folgender Struktur zusammensetzte: 5'-Purin-Purin-CpG-Pyrimidin-Pyrimidin-3' (Krieg et al., 1995).

1.3 Das CpG-Prinzip

Die DNA setzt sich aus den vier Nukleotiden Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin zusammen. Somit sollte das Dinukleotid CpG mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 1:16 erscheinen. Dies trifft auch für bakterielle DNA zu. In Eukaryonten jedoch ist die Wahrscheinlichkeit für das Vorfinden dieser Sequenz um circa ein Fünftel verringert (Bird, 1986). Die oben von Krieg erwähnte Sequenz ist in Vertebraten sogar noch stärker supprimiert.

Ein weiterer entscheidender Unterschied zwischen bakterieller und eukaryonter DNA besteht in der Methylierung des zentralen Cytosins. Bei Bakterien ist nur ein kleiner Bruchteil der DNA methyliert während bei Wirbeltieren der Anteil methylierten Cytosins über 80 Prozent beträgt (Razin and Friedman, 1981). Eine Methylierung des zentralen Cytosins bewirkt eine fast vollständige Zerstörung des immunstimulatorischen Effektes (Krieg et al., 1995). Somit weist bakterielle DNA einige immer wiederkehrende Muster auf, die es dem Immunsystem erlauben, zwischen „Selbst“ und „Fremd“ zu differenzieren. Solche wiederkehrende Muster werden in der Immunologie als „pathogen associated molecular patterns“ (PAMP) bezeichnet. Für deren Erkennung hat das Immunsystem Proteine bereits auf der Stufe des angeborenen Immunsystems entwickelt, die PAMPs identifizieren und die Immunantwort in bestimmte Bahnen lenken können. Diese Moleküle werden „pattern recognition receptors“ (PRR) genannt (Janeway, Jr., 1989). Zu dieser Gruppe gehört der CD14-Rezeptor, der Lipopolysaccharide aus der Wand gramnegativer Bakterien erkennt (Pugin et al., 1994).

Die am besten charakterisierte Gruppe der PRR sind die „Toll-like Rezeptoren“ (TLR), von deren Familie bisher im menschlichen System mehrere Mitglieder identifiziert worden sind (Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002). Eine Untergruppe dieser Familie, der Toll-like Rezeptor 9 (TLR9), ist für die Erkennung von viraler und intrazellulärer bakterieller DNA verantwortlich (Hemmi et al., 2000). Verschiedene TLRs kommen in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle vor und erkennen bestimmte Strukturen. TLR9 wird membrangebunden unter anderem in Endosomen exprimiert (Ahmad-Nejad et al., 2002). Die Zellpopulationen, die TLR9 exprimieren unterscheiden sich von Spezies zu Spezies. Bei Mäusen scheinen Zellen der myeloiden Reihe den TLR9 zu tragen. Bei Menschen scheint der TLR9 hauptsächlich auf plasmazytoiden dendritischen Zellen und auf B-Zellen beschränkt zu sein (Takeshita et al., 2001; Bauer et al., 2001; Hornung et al., 2002).

1.4 Wirkungen von CpG-DNA auf das Immunsystem

Die Effekte von CpG-DNA können in zwei Stadien eingeteilt werden. In einem frühen Schritt kommt es zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems während es danach zu einer Verbesserung der adaptiven Antwort auf ein Pathogen kommt.

Kurz nach Exposition mit CpG-DNA werden die Oligodesnukleotide (ODNs) endozytiert und gelangen somit in das Endosom. Im Endosom erfolgt der Kontakt mit dem TLR9 (Ahmad-Nejad et al., 2002). Diese Interaktion führt zu einer Signaltransduktion über das Adaptorprotein MyD88, die IL1-Rezeptor-assoziierte Kinasen (IRAK-1, -2 und -m) und TNF-Rezeptor-assoziiertes Protein 6 (TRAF6) (Wesche et al., 1997) mit anschließender Aktivierung mehrerer Transkriptionsfaktoren wie Nuclear-Faktor κ B (NF κ B), Activating Protein (AP1), CCAAT/enhancer binding Protein (CEBP) und cAMP-responsive element binding Protein (CREB) (Hacker et al., 2000; Yamamoto et al., 2002). Diese aktivierten Transkriptionsfaktoren führen zur Expression spezieller Gene. Hierdurch kommt es zur Hochregulation von Chemokinen (Chemotaktische Zytokine), die Wanderungsbewegung von T-Zellen und B-Zellen zur Folge haben (Kim and Broxmeyer, 1999). Weiter kommt es zu einem verminderten Ansprechen der Zellen auf Apoptosereize (Yi et al., 1996) sowie zur Ausschüttung von Interferonen, TNF α , IL-1 und IL-6, die eine sogenannte TH1-Antwort favorisieren (Lipford et al., 1997). Interferon führt zu einer Ausreifung von antigenpräsentierenden Zellen und im Zusammenspiel mit anderen Chemo- und Zytokinen kommt es innerhalb von Stunden zu weiteren Effekten wie NK-Zell-Aktivierung, Hochregulation von Fc-Rezeptoren auf Effektorzellen wie Granulozyten, die ebenfalls erhöhte Wanderungs- und Phagozytoseaktivität zeigen (Krieg, 2002). Somit ist es in einer ersten Phase zu einer Aktivierung der Komponenten des angeborenen Immunsystems gekommen. Im zweiten Schritt kommt es nun zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems. B-Zellen erfahren eine starke Kostimulation, wenn sie spezifisches Antigen binden und gleichzeitig über den TLR9-Rezeptor stimuliert werden. Dies führt zu einer verstärkten Bildung von antigenspezifischen Antikörpern (Krieg et al., 1995). Die Präsentation von Antigen an T-Zellen im Zusammenhang mit CpG-Stimulation kann nun soweit führen, dass es zu einer Induktion einer primären zytotoxischen T-Zell-Antwort ohne weitere T-Zell-Hilfe kommen kann (Wild et al., 1999; Sparwasser et al., 2000).

1.5 Einflüsse von Chemokinen auf die Verteilung von Leukozyten

Chemokine (chemotaktische Zytokine) sind kleine sezernierte oder membrangebundene Proteine mit einem Molekulargewicht von 6 – 14 kDa (Baggiolini et al., 1994; Rollins, 1997). Sie werden je nach terminaler Aminosäurezusammensetzung in vier Subgruppen unterteilt (Rollins, 1997).

Chemokine üben Funktionen in der Regulation der Proliferation und Mobilisation von hämatopoetischen Zellen aus (Broxmeyer et al., 1999).

Eine der Hauptfunktionen von Chemokinen besteht in der Chemotaxis von Leukozyten und der Regulation der Leukozytenmigration. Naive Lymphozyten verlassen die primären Lymphorgane und wandern in sekundäres lymphatisches Gewebe ein. Hierunter zählen die peripheren Lymphknoten, die Milz und die Peyer Plaques im Darm. Dieses sekundäre lymphatische Gewebe ist darauf spezialisiert, Antigene zu sammeln und diese dann den Lymphozyten zu präsentieren. Dabei rezirkulieren die Lymphozyten zwischen Blut und sekundären Lymphorganen bis sie entweder apoptotisch oder durch ein Antigen aktiviert werden (Picker und Butcher, 1992). Diese Wanderungsbewegungen werden wohl zum Teil durch Expression von bestimmten Chemokinen in lymphatischem Gewebe und andererseits durch Expression von Chemokinrezeptoren auf bestimmten Zellen ausgelöst und gezielt geleitet. Die Expressionsmuster lassen vermuten, dass Chemokine wie SDF-1 (Stromal Cell-Derived Factor), SLC (Secondary Lymphoid Tissue Chemokine), ELC (EBI (EBV-Induced gene) 1-Ligand Chemokine) einerseits die T-Zellmigration in sekundäre Lymphorgane und dann in T-Zellzonen leiten (Gunn et al., 1998). Weiterhin besteht die Vermutung, dass die gleichen Chemokine eine wesentliche Rolle in der B-Zellmigration in lymphatisches Gewebe spielen (Kim und Broxmeyer, 1999). Darüber hinaus ist bekannt, dass verschiedene Stimuli die Expression bestimmter Chemokine induzieren können. Zu diesen Induktoren zählen die Zytokine IL-1, TNF- α und IFN- γ , Lipopolisaccharid (LPS) sowie virale Infektionen (Baggiolini et al., 1994). Weiterhin ist bekannt, dass es bei Gabe von CpG-ODNs zu einer Hochregulation des CCR7-Rezeptors auf dendritischen Zellen kommt (Krug et al., 2003). Dieser Rezeptor bindet die beiden oben erwähnten Chemokine ELC und SLC.

1.6 Verteilung und Kinetik von Granulozyten

Granulozyten sind Bestandteil der angeborenen Abwehr des Immunsystems. Sie werden in neutrophile, basophile und eosinophile Zellen unterteilt. Von diesen drei Zelltypen sind die Neutrophilen mit ca. 95 % weit in der Mehrzahl. Granulozyten befinden sich im wesentlichen in vier Kompartimenten (Junqueira & Carneiro, 1995). Ihre Bildung zu reifen Zellen erfolgt im Knochenmark. Ein Teil der gereiften Zellen verbleibt im Knochenmark und bildet einen Reserveanteil, der bei Bedarf freigesetzt werden kann (Smeaton, 1984). Bei der Aufrechterhaltung einer normalen Freisetzung der Granulozyten aus dem Knochenmark zur Garantierung einer Neutrophilenantwort bei einer Infektion spielen mehrere Faktoren wie der Granulozytenkoloniestimulierende Faktor (G-CSF) eine Rolle (Demetri and Griffin, 1991). Die Produktion von G-CSF wird u.a. durch bakterielle Bestandteile, TNF α und Interleukin-1 induziert (Rennick et al., 1987). Eine weitere Fraktion zirkuliert im Blut. Eine gleich große Anzahl ist in den Blutgefäßen als randständige Zellen vorhanden, wobei die Zellen zwischen beiden Kompartimenten wechseln können. Der Anteil der im Knochenmark befindlichen Zellen ist circa zehnfach größer als der im Blut befindlichen (Athens et al., 1961). Aus dem Blut durchwandern Zellen im weiteren Verlauf die Gefäßwand und gelangen so in das Bindegewebe.

1.7 Immunprotektive Effekte von CpG-DNA

Mehrere Studien konnten zeigen, dass CpG-DNA die angeborene Immunantwort des Organismus gegen eine Reihe von Pathogenen deutlich verbessert. Hierbei wird vor allem die frühe Proliferations- und Ausbreitungsphase gehemmt und in einem zweiten Schritt erfolgt die Elimination des Pathogens durch eine stark verbesserte adaptive Immunantwort.

In diesem Zusammenhang wurden protektive und therapeutische Effekte in Mäusen beschrieben, die durch Parasiten wie Leishmanien und Schistosomen infiziert wurden (Zimmermann et al., 1998; Chiaramonte et al., 2000). Ebenfalls protektive Effekte wurde bei Virusinfektionen wie dem Ebola-Virus, Herpes simplex- und dem Cytomegalie-Virus nachgewiesen (Ashkar et al., 2003). Einige Studien zeigten darüber hinaus, dass CpG-ODNs

die Infektabwehr bei immunsupprimierten Individuen, deutlich verbessern können (Ito et al., 2004).

Neben einer Aktivierung des Immunsystems von Säugetieren konnte auch ein positiver Effekt auf Fische und Vögel nachgewiesen werden, was weiterhin zeigt, dass es sich bei der Erkennung von CpG-DNA um einen über Jahrtausende beibehaltenen Beitrag zum Überleben des Wirtsorganismus handelt (Kanellos et al., 1999; Gomis et al., 2004).

Jedoch wurden auch negative Effekte durch Applikation von CpG-DNA festgestellt. So zeigten Olbrich et al., dass eine Vorbehandlung mit CpG-DNA Mäuse anfälliger für eine durch Friend-Retrovirus induzierte Leukämie macht (Olbrich et al., 2003).

2 FRAGESTELLUNG

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation soll der Einfluss von CpG-DNA auf die Verteilung von Immunzellen im Körper untersucht werden.

Hierbei sollen in einem ersten Schritt die Auswirkungen auf das Blutbild erfasst werden. Parameter, die herangezogen werden, sind die Zellzahl im Blut, das Differentialblutbild, Veränderungen von Subpopulationen sowie Unterschiede in der Expression von Oberflächenmarkern.

In einem zweiten Teil sollen Veränderungen in Lymphknoten und Milz aufgezeigt werden. Zu untersuchende Parameter sind wiederum die Zellularität, Veränderungen in der Zusammensetzung sowie Untersuchung verschiedener Oberflächenmarker auf Zellen in den erwähnten Organen.

Darüber hinaus sollen Unterschiede in der Applikationsart der DNA verglichen und der Einfluss von Chemokinen auf die Verteilung der Zellen untersucht werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Mäuse

Verwendet wurden weibliche 18-22g schwere C57/BL6- und TNFR(p55)^{-/-}-Mäuse im Alter von 6 bis 10 Wochen.

Die Mäuse wurden im Tierstall des Instituts unter pathogenfreien Bedingungen gehalten.

3.2 Reagenzien

3.2.1 Ammoniumchlorid-Lösung

Zur Lyse von roten Blutkörperchen wurde trisgepufferte 140mM Ammoniumchlorid Lösung verwendet. Zu deren Herstellung wurde 8,3 g NH₄Cl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in 1000 ml Aqua_{bidest} gelöst und 111 ml Tris (170 mM) gepuffert. Diese Lösung wurde auf einen pH von 7,2 eingestellt und über einen Faltenfilter filtriert und danach bei 4 °C gelagert.

3.2.2 Eosin-Färbelösung

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

3.2.3 Paraformaldehyd – Fixierlösung

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

3.2.4 Phosphat gepufferte Salzlösung

1 g MgCl₂ (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) sowie 1 g CaCl₂ (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurden in 9,16 l Aqua_{bidest} gelöst und auf einen pH von 7,2 eingestellt danach durch einen 0,2µm Filter steril filtriert und bei 4 °C gelagert

3.2.5 5 x DNase-I-Puffer

Aus folgenden Lösungen wurden Mischungen hergestellt, danach steril filtriert und danach bei -20 °C gelagert.

Tris-HCl (Tris- Hydroxymethyl-Aminomethan), pH 7,5	250 mM
Magnesiumchlorid	50mM
BSA (Rinderserumalbumin)	250 µg/ml

3.2.6 Oligodeoxynukleotide (ODN)

Die verwendeten ODN wiesen statt einer Diester-Bindung eine Phosphothioat-Bindung zwischen den Nukleotiden auf.

Alle verwendeten ODN wurden von der Firma TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin, Deutschland hergestellt.

Name	Sequenz (5' → 3')
1668	TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT
1720	TCC ATG AGC TTC CTG ATG CT

Die Phosphothioat-Modifizierung von Oligodeoxynukleotiden bewirkt verstärkte Resistenz gegen den Abbau durch DNAsen (Stein et al., 1988). CpG ODNs wurde in einer 250 μ M Stammlösung mit sterilem Ultra-Pure Wasser (Biochrom, Berlin, Deutschland) angesetzt, und durch 0,2 μ m-Filter steril filtriert.

3.2.7 Antikörper

Alle für die FACS Färbungen verwendeten Antikörper wurden von der Firma BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Folgende Antikörper wurden für FACS Färbungen verwendet.

Oberflächenantigen	Herkunft des Antikörpers	Ursprungsspezies
CD3	BD Pharmingen, Heidelberg	Ratte
CD11b/Mac1	BD Pharmingen, Heidelberg	Ratte
CD-45R/B220	BD Pharmingen, Heidelberg	Ratte
Ly-6G/Gr1	BD Pharmingen, Heidelberg	Ratte

3.3 Methoden

3.3.1 Injektionen

Intraperitoneale Injektion

Nach Sprüh- und Wischdesinfektion des Felles wurden 10 nmol ODN gelöst in 100 μ l PBS mittels einer Tuberkulinspritze in den linken unteren Quadranten des Abdomens der Maus injiziert

Injektion in den Fußballen

Nach Sprüh- und Wischdesinfektion wurden 5 nmol des ODN gelöst in 50 µl PBS mittels einer Tuberkulinspritze subkutan in den Fußballen injiziert.

3.3.2 Blutgewinnung

Blut wurde durch eine Stichinzision mit einer sterilen 24G-Nadel gewonnen und direkt in eine EDTA-beschichtete Kapillare überführt. Um weiteren Blutverlust zu verhindern, wurde mit sauberen Tupfern Druck auf die Inzisionsstelle ausgeübt.

3.3.3 Blutzellzählung und Analyse

Die Zählung der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten erfolgte mittels dem Zählgerät vet-ABC der Firma scil Company (Viernheim, Deutschland)

Weiterhin wurden Blutausstriche angefertigt und mit Giemsalösung angefärbt. Von diesen Blutausstrichen wurden mindestens hundert Zellen zur weiteren Differenzierung unter dem Lichtmikroskop gezählt. Zur Bestimmung absoluter Zellzahlen im Blut wurden Prozentwerte aus dem erhaltenen Differentialblutbild mit den zuvor bestimmten Leukozytenzahlen multipliziert.

3.3.4 Präparation von Lymphknoten - und Milzzellen

An den Versuchstagen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die inguinalen und poplitealen Lymphknoten sowie die Milz steril entnommen. Die Organe wurden durch Stahlsiebe gedrückt. Die daraus resultierende Zellsuspension wurde zweimal mit PBS + 2% FCS gewaschen. Mittels einer Supravitalfärbung mit Eosin konnten die lebenden Zellen gezählt werden.

3.3.5 Messung der Expression von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann man Zellen nach ihrer Größe („forward scatter“ = FS), nach ihrer Granularität („sideward scatter“ = SS) und nach ihrer Fluoreszenz beurteilen. Die Fluoreszenz der Zellen ist abhängig von dem Grad ihrer Eigenfluoreszenz und den verwendeten Antikörpern. Die Antikörper, die gegen verschiedene Oberflächenantigene der Zellen gerichtet sind, sind mit Farbstoffen markiert. Durch Einsatz unterschiedlicher Antikörper, die z.B. gegen Differenzierungsoberflächenantigene („linage marker“) gerichtet sind, kann die Expression bestimmter Aktivierungsoberflächenantigene in Zellsubpopulationen getrennt ermittelt werden. Hier stellt die unspezifische Bindung von Antikörper oder Farbstoff ein Problem dar. Zellen wie Makrophagen und DCs, besitzen Oberflächenrezeptoren, die Antikörper an ihrer konstanten Region, oder an dem gekoppelten Farbstoff binden. Dies führt zu einer unerwünschten Markierung von Zellen, die das gesuchte Oberflächenantigen nicht besitzen. Dieser Effekt einer unspezifischen Bindung wurde durch Blockierung dieser Rezeptoren mit gegen sie gerichteten Antikörpern (α CD-16/CD32) verhindert.

Zum Ausschluss unspezifischer Bindung wurden Parallelfärbungen mit Antikörpern desselben Typs und mit demselben Farbstoff vorgenommen. Diese Antikörper können aber kein spezifisches Antigen an diesen Zellen erkennen und nur unspezifisch gebunden werden. Damit wurde die Rate falsch positiver Zellen bestimmt, die dann von der Rate der positiven Zellen in der spezifischen Färbung abgezogen wurde.

Für die spezifischen Färbungen wurden die Zellen mit PBS + 2% FKS gewaschen und für die Blockade unspezifischer Bindungsstellen zunächst 2 μ l α -CD16/CD32 für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Antikörper für spezifische Färbung waren entweder direkt mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) markiert. Für die spezifische Färbung wurden Zellen mit entsprechenden Antikörpern für 30 min bei 4 °C inkubiert und zweimal mit PBS + 2%FKS gewaschen. Die so behandelten Zellen wurden mit 1%-Paraformaldehyd-Lösung fixiert und an dem Fluoreszenzaktivierten Zellsortierer (FACS) EPICS XL (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) analysiert.

3.3.6 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Um die Expression von mRNA der Chemokine ELC und SDF zu untersuchen, wurde eine Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt.

Nach Extraktion der RNA wurde die optische Dichte der RNA photometrisch bestimmt und aus der mRNA im nächsten Schritt cDNA transkribiert. Die so erhaltene cDNA wurde zunächst in einer Realtime Taqman PCR verwendet und die eingesetzten Mengen der cDNA angeglichen. Mit diesen cDNA Mengen wurde dann die PCR auf ELC bzw. SDF durchgeführt. So konnte eine semiquantitative Aussage über einen Vergleich der densitometrisch bestimmten Bandenintensitäten getroffen werden.

RNA-Isolation

Mäusen wurden nach Behandlung mit ODN die peripheren Lymphknoten und die Milz entfernt. Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die in der Milz verbliebenen Erythrozyten durch Lyse mit Ammoniumchloridlösung entfernt. Aus beiden Organen wurden 2×10^6 Zellen verwendet. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 0,5 ml TriFast (Peqlab, Erlangen, Deutschland) lysiert und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Der Suspension wurde 0,1 ml Chloroform (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zugegeben. Nach Inkubation (5 Minuten, RT) erfolgte die Zentrifugation (12000x g, 15 Minuten, 4 °C) zur Phasentrennung. Die wässrige Phase wurde abgenommen die RNA mit 0,5 ml Isopropanol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefällt (10 Minuten, RT) und durch Zentrifugieren pelletiert (12000x g, 10 min, 4 °C). Nach einem Waschschrift mit 75 % Ethanol wurde das RNA-Pellet 5 Minuten luftgetrocknet. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit einem UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde zusätzlich die optische Dichte (OD) bei 280 nm gemessen und der Quotient aus OD 260 nm zu OD 280 nm gebildet. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die RNA wurde in 30 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -70 °C gelagert.

cDNA-Synthese

Zur Transkription der RNA in cDNA wurden alle Reagentien von Perkin-Elmer (Foster City, CA, USA) bezogen. 5 µl RNA wurden mit 2,5 µl random Primer (50 µM), 5 µl Puffer (KCl

500 mM, TrisHCl 100 mM), 11 µl MgCl₂ (25 mM), 10 µl dNTP (10 mM), 1 µl RNase Inhibitor (20 U/µl), 0,5 µl reverse Transkriptase (50 U/µl) und 15 µl DEPC-Wasser für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Darauf folgten Inkubationsschritte von 30 Minuten bei 48 °C und 5 Minuten bei 95 °C. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Realtime TaqMan PCR

Um bei der semiquantitativen PCR gleiche Mengen eines „housekeeping gens“ einzusetzen, wurde vorher eine Realtime TaqMan PCR durchgeführt. Während bei konventioneller PCR Nachweis und Mengenabschätzung der Zielsequenz durch Gelelektrophorese des PCR-Produkts erfolgen, macht man sich bei der Taqman PCR die Spaltung fluorogener Sonden (Taqman Probes) durch 5'3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zunutze. TaqMan-Sonden sind am 5'-Ende mit einem Reporter- und am 3'-Ende mit einem Quentcherfarbstoff markiert. Ihre Sequenz wird so gewählt, dass sie als „internal probes“ zwischen den beiden PCR-Primern an die Zielsequenz binden. Die Spaltung der TaqMan-Sonde durch die 5'3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase verhindert das Quentching und führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Durch kontinuierliche Detektion der Fluoreszenzintensität von Reporter- und Quentcherfarbstoff während der einzelnen PCR-Zyklen, lässt sich der Threshold-Cycle (CT) als der Zyklus bestimmen, bei dem die Reporterfluoreszenz das Basissignal signifikant übersteigt. Der CT ist umso niedriger, je höher die Menge an Zielsequenz ist und ist die Basis der Quantifizierung mit TaqMan PCR. Um Schwankungen in den Mengen an cDNA auszugleichen, wurde die Expression des „housekeeping gens“ β-Actin bestimmt. Anhand des ermittelten CT wurde die für die semiquantitative PCR einzusetzende Menge an DNA bestimmt.

Folgende Primer und Taqman-Sonden wurden verwendet

5'-Primer: 5' - AGG TCA TCA CTA TTG GCA ACG - 3'

3'-Primer: 5' - CAC TTC ATG ATG GAA TTG AAT - 3'

1 µl Probe (10 pmol/µl) 5' - TGC CAC AGG ATT CCA TAC CCA AGA AGG - 3'

Folgende Reagenzien wurden von Perkin-Elmer (Foster City, CA, USA) bezogen und mit 1µl cDNA in der Realtime Taqman PCR verwendet:

je 0,5 µl Primer

0,5 µl Probe

0,6 µl Polymerase

0,6 µl dNTPs (10 nMol)

3 µl MgCl₂ (25 Mmol)

3 µl Puffer

20,3 µl dH₂O

Für die PCR wurden folgende Zyklusbedingungen gewählt:

95 °C für 5 Minuten, 30 Zyklen mit 95 °C für 15 Sekunden und 60 °C für 1 Minute (Annealing-Temperatur) und 72 °C für 30 Sekunden (Extensionstemperatur) PCR-Reaktion und Fluoreszenzmessung wurden mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detector von Perkin-Elmer (Foster City, CA, USA) durchgeführt.

Semiquantitative PCR

Die Primer wurden von MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert.

Folgende Primer wurden verwendet:

SDF

5'-Primer: 5' - TGC ATC AGT GAC GGT AAA CCA - 3'

3'-Primer: 5' - GTT CTT CAG CCG TGC AAC AAT - 3'

ELC

5'-Primer: 5' - GGT GCT AAT GAT GCG GAA GAC - 3'

3'-Primer: 5' - AGA CAC AGG GCT CCT TCT GGT - 3'

β -Actin

5'-Primer: 5' - TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C - 3'

3'-Primer: 5' - TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G - 3'

Nach Bestimmung der Menge an einzusetzender DNA durch die Realtime Taqman PCR wurde folgende Reagenzien, bezogen von Perkin-Elmer (Foster City, CA, USA), mit 1 μ l cDNA für die PCR verwendet:

je 1 μ l Primer (25 pmol/ μ l)

1 μ l Polymerase

1 μ l dNTPs (10 nMol)

4 μ l MgCl₂ (25 Mmol)

5 μ l Puffer

36 μ l dH₂O

Für die PCR auf SDF und β -Actin wurden folgende Zyklusbedingungen gewählt:

95 °C für 3 Minuten, 35 Zyklen mit 95 °C für 30 Sekunden und 60 °C für 30 Sekunden (Annealing-Temperatur) und 72 °C für 45 Sekunden (Elongationstemperatur), nach 35 Zyklen 72 °C für 10 Minuten.

Für die PCR auf ELC wurden folgende Zyklusbedingungen gewählt:

95 °C für 3 Minuten, 35 Zyklen mit 95 °C für 30 Sekunden und 62 °C für 30 Sekunden (Annealing-Temperatur) und 72 °C für 45 Sekunden (Elongationstemperatur). Nach 35 Zyklen 72 °C für 10 Minuten.

Elektrophoretische Trennung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 1,5%-Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Dazu wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1xTAE-Puffer gelöst und 4 μ l Ethidiumbromid zugegeben. 15 μ l der Proben wurden mit 3 μ l Ladepuffer versetzt, aufgetragen und bei 120 V getrennt. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein DNA-Größenmarker eingesetzt.

3.4 Statistische Auswertung

Für die graphische Darstellung wurden Mittelwerte aus mehreren Experimenten verwendet. Die statistische Auswertung auf signifikante Unterschiede verschiedener Stimuli im Vergleich zu einer Kontrollgruppe erfolgte mittels "Student's t-Test".

4 ERGEBNISSE

4.1 Effekte von CpG-DNA auf Blutzellen

Das im Gefäßsystem zirkulierende Blut kann in einen flüssigen Teil, das Blutplasma, und einen geformten Anteil, die Blutzellen, unterschieden werden. Die Konzentration und der Aktivitätszustand der Blutzellen in einem Volumenanteil Blut ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Der geformte Anteil des Blutes kann weiter in rote Blutzellen (Erythrozyten), weiße Blutzellen (Leukozyten) und Blutplättchen (Thrombozyten) unterschieden werden.

CpG-DNA hat auf die Zellen des Blutes starke Einflüsse und ruft in ihnen eine Vielzahl von verschiedenen Reaktionen hervor.

4.1.1 Einflüsse auf Leukozyten

Leukozyten stellen einen großen Teil der Blutzellen dar. Ihre Zahl im Blut gibt in vielen Fällen Anhaltspunkte über den Status des Immunsystems. Sie können lichtmikroskopisch weiter in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten unterteilt werden. Durch immunologische Methoden wie FACS erfolgt eine weitere Differenzierung in Untergruppen, da diese auf ihrer Oberfläche verschiedene Antigene exprimieren.

4.1.1.1 Effekte auf die Leukozytenzahl

Die Zahl der Leukozyten im peripheren Blut kann sich unter dem Einfluss von vielen Faktoren verändern. Die Kinetik dieser Entwicklung folgt meist einem dem Stimulus typischen Muster.

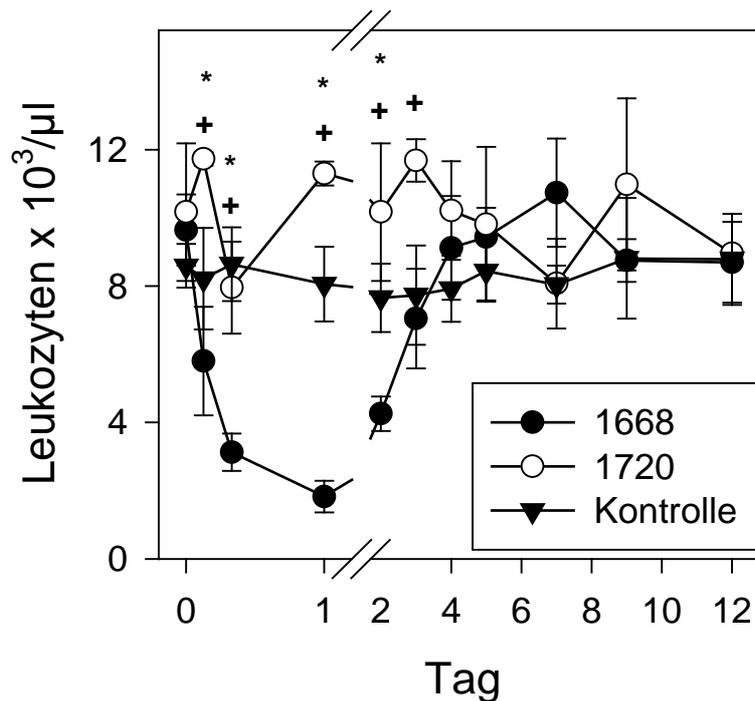


Abbildung 1: Leukozytenkinetik nach ip-Gabe von ODN

C57/BL6-Mäusen (jeweils 5 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100 µl PBS) (schwarze Punkte) bzw. 10 nmol 1720 (in 100 µl PBS) (weiße Punkte) bzw. 100 µl PBS (schwarze Dreiecke) steril intraperitoneal injiziert. Die erste Blutabnahme erfolgte vor Injektion, weitere nach 3 Stunden, 8 Stunden sowie zu den angegebenen Zeitpunkten.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Leukozytenzellzahl von Fünffachbestimmungen.

* : signifikant unterschiedlich zu Kontrolle bei $p < 0,05$

+ : signifikant unterschiedlich zu 1720 bei $p < 0,05$

Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, kam es nach streng steriler intraperitonealer Gabe von 10 nmol des ODNs 1668 sehr rasch zu einer Abnahme der Leukozytenzahl im Blut von C57/BL6-Mäusen bereits nach drei Stunden. Der maximale Tiefpunkt wurde nach 24 Stunden erreicht. Mit einer absoluten Zellzahl von 1800 Zellen pro Mikroliter Blut fiel dieser Wert auf 23 % des Wertes der Kontrollgruppe ab. Danach folgte eine Erholung der Leukozytenzahl und vier Tage nach Verabreichung der CpG-DNA erreichten die Zählwerte wieder die der Kontrollgruppe. Die Gabe des Kontroll-ODNs 1720 hatte in allen durchgeführten Experimenten Schwankungen der Zellzahl meist ein wenig oberhalb der Kontrollgruppe zur Folge, zeigten jedoch keine Abnahme der Leukozyten im peripheren Blut.

Weiterhin war die Frage interessant, ob es einen Unterschied in der Kinetik der Leukozytenveränderungen im Blut gibt, wenn das ODN auf einem anderen Weg appliziert wird. Da die intraperitoneale Verabreichung als systemische Gabe definiert wurde, sollte nun eine lokale Gabe in den Fuß der Mäuse erfolgen.

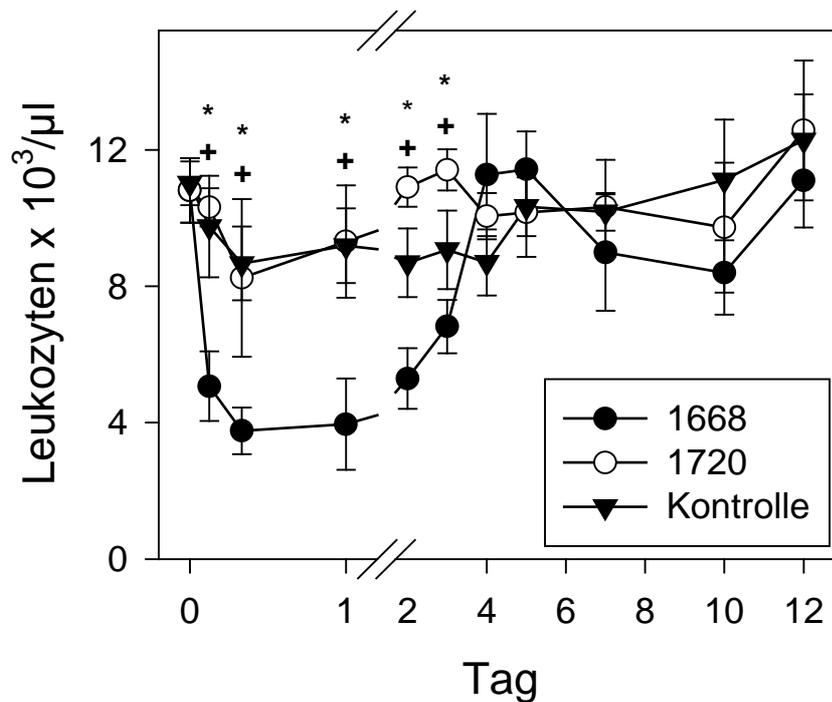


Abbildung 2: Leukozytenkinetik nach Gabe von ODN in den Fuß

C57/BL6-Mäusen (jeweils 5 pro Gruppe) wurden 5 nmol 1668 (in 50 µl PBS) (schwarze Punkte) bzw. 5 nmol 1720 (in 50 µl PBS) (weiße Punkte) bzw. 50 µl PBS (schwarze Dreiecke) steril in den rechten Fußballen injiziert. Die erste Blutabnahme erfolgte vor Injektion, weitere nach 3 Stunden, 8 Stunden sowie zu den angegebenen Zeitpunkten.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Leukozytenzellzahl von Fünffachbestimmungen

* : signifikant unterschiedlich zu Kontrolle bei $p < 0,05$

+ : signifikant unterschiedlich zu 1720 bei $p < 0,05$

Hierbei zeigte sich eine ähnliche Kinetik bei der Veränderung der Leukozytenzahlen im peripheren Blut wie bei einer intraperitonealen Gabe des ODNs (Abbildung 2).

Ebenfalls wurde in der Arbeitsgruppe Lipford 10 nmol 1668 intravenös in eine Schwanzvene injiziert und danach die Entwicklung der Leukozytenzahlen im peripheren Blut verfolgt. Hierbei zeigte sich eine identische Kinetik der weißen Blutzellen (Daten nicht gezeigt).

Die Auswirkungen auf die Leukozytenzahlen hatten sich somit unabhängig vom Applikationsweg gleich verhalten.

4.1.1.2 Effekte auf Lymphozyten und Granulozyten

Leukozyten im Blut lassen sich noch weiter v. a. in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten unterteilen. Im Gegensatz zum Menschen ist das Blutbild von C57/BL6-Mäusen ein sogenanntes lymphozytäres Blutbild d.h. es besteht im Normalfall aus ca. 75-85 % Lymphozyten, 10-20 %-Granulozyten und ca. 2-5 % Monozyten. Nach der Beobachtung einer Leukopenie aufgrund der Applikation des ODNs 1668 wurde untersucht, welche Untergruppen von Leukozyten am stärksten auf die Applikation reagieren.

4.1.1.2.1 EFFEKTE AUF LYMPHOZYTEN

Da wie oben erwähnt der größte Anteil der Leukozyten sich aus der Lymphozytenpopulation rekrutiert, wurde der Entwicklung der Lymphozytenzahl nach 1668-Gabe besondere Bedeutung zugeschrieben.

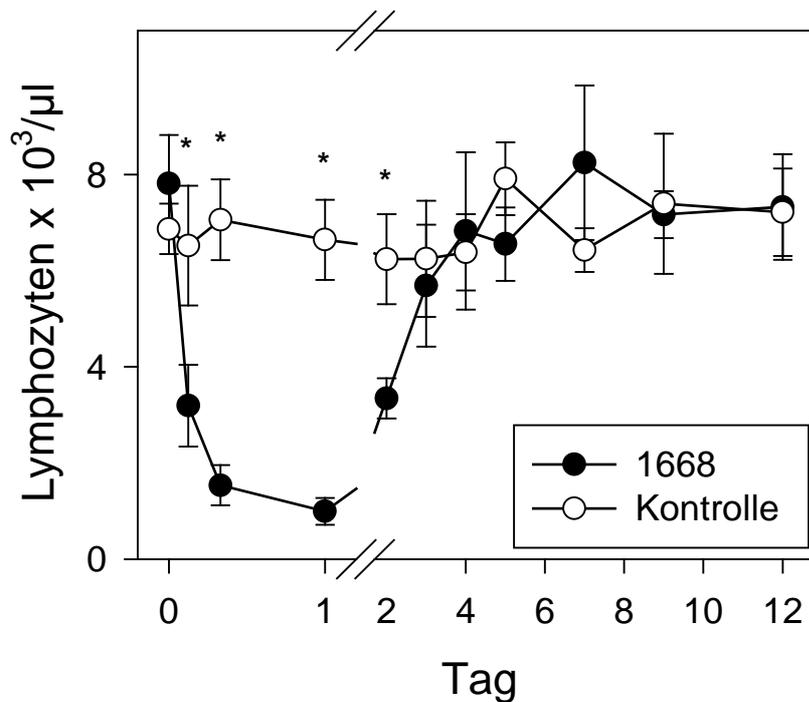


Abbildung 3: Lymphozytenkinetik nach ip-Gabe von CpG-ODN

C57/BL6-Mäusen (jeweils 5 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100 µl PBS) (schwarze Punkte) bzw. 100 µl PBS (weiße Punkte) streng steril intraperitoneal injiziert. Die erste Blutabnahme erfolgte vor Injektion., weitere nach 3 Stunden, 8 Stunden sowie zu den angegebenen Zeitpunkten. Direkt nach Blutabnahme wurden Blutausrichungen angefertigt, mit Giemsa-Lösung angefärbt und unter dem Lichtmikroskop nach Zelltypen differenziert. Die erhaltenen Prozentwerte wurden mit den absoluten Zellzahlen der Leukozyten multipliziert und somit die absolute Zellzahl der Lymphozyten bestimmt

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Lymphozytenzellzahl von Fünffachbestimmungen

* : signifikant unterschiedlich zu Kontrolle bei $p < 0,05$

Wie aus Abbildung 3 zu ersehen ist, kommt es nach Gabe von 10 nmol 1668 sehr rasch zu einem Abfall der Lymphozyten von $7,8 \times 10^3$ auf 1×10^3 nach 24 Stunden. Am 3. Tag nach Injektion des ODNs hat sich die Lymphozytenzahl wieder erholt und die Ausgangswerte erreicht.

4.1.1.2.2 EFFEKTE AUF GRANULOZYTEN

Die Abbildung 3 zeigte, dass die Kinetik der Lymphozytopenie weitgehend parallel zu der der Leukozyten verläuft. Hierdurch zeigt sich, dass die Leukopenie vor allem eine Folge der Lymphozytopenie ist.

Jedoch sollte weiterhin untersucht werden wie sich die zweite große Population, die Granulozyten, verhalten.

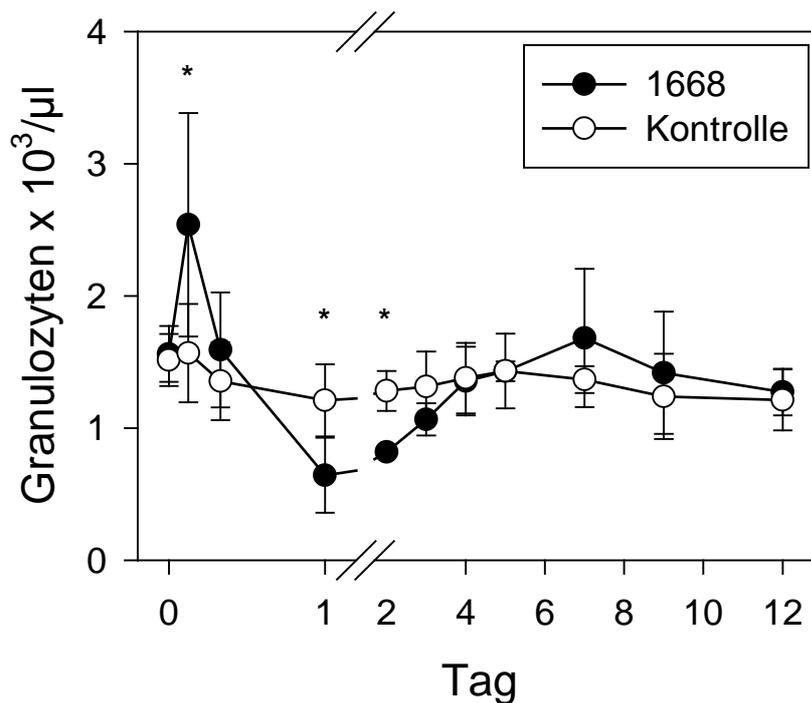


Abbildung 4: Granulozytenkinetik nach ip-Gabe von CpG-ODN

C57/BL6-Mäusen (jeweils 5 pro Gruppe) wurde 10 nmol 1668 (in 100 µl PBS) (schwarze Punkte), 100 µl PBS (weiße Punkte) streng steril intraperitoneal injiziert. Die erste Blutabnahme erfolgte vor Injektion, weitere nach 3 Stunden, 8 Stunden sowie zu den angegebenen Zeitpunkten. Direkt nach Blutabnahme wurden Blutausrichungen angefertigt, mit Giemsa-Lösung angefärbt und unter dem Lichtmikroskop nach Zelltypen differenziert. Die erhaltenen Prozentwerte wurden mit den absoluten Zellzahlen der Leukozyten multipliziert und somit die absolute Zellzahl der Granulozyten bestimmt

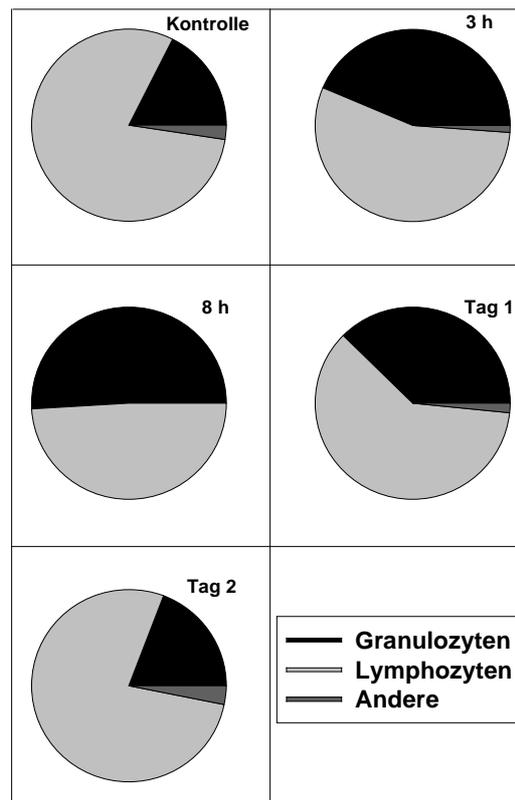
Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Lymphozytenzellzahl von Fünffachbestimmungen

* : signifikant unterschiedlich zu Kontrolle bei $p < 0,05$

Abbildung 4 zeigt, dass sich die Granulozytenzahl unterschiedlich zur Lymphozytenzahl entwickelt. In allen durchgeführten Experimenten kam es drei Stunden nach Verabreichung der CpG-DNA zu einem signifikanten Anstieg der Granulozytenzahl um mehr als 60 % (von

$1,5 \times 10^3$ auf $2,5 \times 10^3$ Granulozyten/ μl). Jedoch war diese nach 24 Stunden auf unter 42 % ($0,64 \times 10^3$ Granulozyten/ μl) des Ausgangswertes zurückgefallen und erreichte ebenfalls an Tag 4 wieder Normalwerte.

Da die Kinetiken der Lymphozyten und der Granulozyten vor allem zu in der ersten Zeit nach Applikation des CpG-ODNs unterschiedlich verlaufen sollen in der folgenden Abbildung die Unterschiede im Differentialblutbild verdeutlicht werden.



A

	Granulozyten [%]	Lymphozyten [%]	Anderer [%]
Kontrolle	17,6	80	2,4
3 Stunden	43,6	55,2	1,2
8 Stunden	51	49	
Tag 1	37,6	60,8	1,6
Tag 2	19,2	77,6	3,2

B

Abbildung 5: Differentialblutbild nach ip-Gabe von CpG-ODN

C57/BL6-Mäusen (jeweils 5 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100 µl PBS), 100 µl PBS streng steril intraperitoneal injiziert. Die erste Blutabnahme erfolgte vor Injektion als Kontrolle, weitere zu den angegebenen Zeitpunkten. Direkt nach Blutabnahme wurden Blutaussstriche angefertigt, mit Giemsa-Lösung angefärbt und unter dem Lichtmikroskop nach Zelltypen differenziert.

Dargestellt ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der Leukozytensubpopulationen von Fünffachbestimmungen

Es kommt somit zu einer relativen Verschiebung der Granulozyten zur Lymphozytenpopulation. Der Anteil der Granulozyten bei Kontrollmäusen liegt bei 17 %. Dieser Anteil erhöht sich 8 Stunden nach ODN-Exposition auf 51 %. Nach zwei Tagen kehren die Anteile von Lymphozyten und Granulozyten wieder auf Ausgangswerte zurück.

4.1.1.3 Auswirkungen auf CD3⁺- und B220⁺-Zellen

Lymphozyten kann man weiter in T- und B-Zellen unterscheiden. Diese Differenzierung ist durch Färbung der Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern möglich. Hierfür wurden zur Markierung der B-Lymphozyten der Antikörper B220 verwendet, da er sehr spezifisch an B-Lymphozyten bindet.

Bei der Identifizierung der T-Lymphozyten wurde ein Anti-CD3-Antikörper verwendet, der an den T-Zellrezeptor bindet.

4.1.1.3.1 AUSWIRKUNGEN AUF DIE ZELLZAHL

Es stellte sich die Frage, ob eine Lymphozytensubpopulation bevorzugt die Blutbahn verlässt. Um dies zu klären wurde 24 Stunden nach Gabe von CpG-DNA, also am Tiefpunkt der Leukozytenzahl im peripheren Blut, Blut von Mäusen entnommen und CD3⁺- und B220⁺-Zellen quantifiziert.

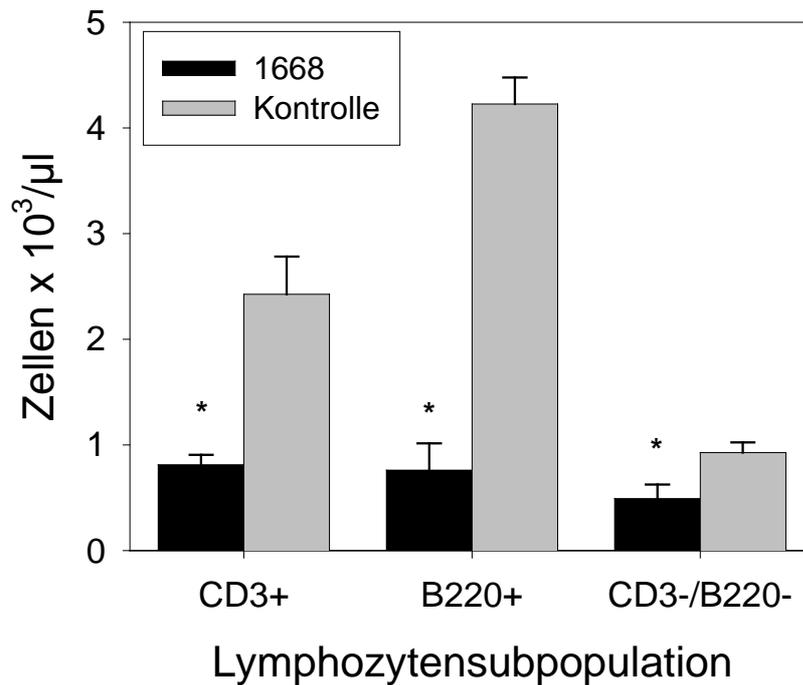


Abbildung 6: Differentialblutbild nach ip-Gabe von CpG-ODN

C57/BL6-Mäusen (jeweils 5 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100µl PBS) bzw. 100 µl PBS streng steril intraperitoneal injiziert. Die Blutabnahme erfolgte 24 Stunden nach der Injektion.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Zellzahlen von Dreifachbestimmungen

* : signifikant unterschiedlich zu Kontrolle bei $p < 0,05$

Es zeigte sich, dass beide Gruppen stark in der Zahl abnehmen. Bevorzugt verlassen jedoch B220⁺-Zellen das Blut. Ihre Zahl ist einen Tag nach Verabreichung von 10 nmol 1668 von $4,2 \times 10^3/\mu\text{l}$ auf $0,76 \times 10^3$ (18 % des Ausgangswertes) gesunken. CD3⁺ Zellen verschwinden ebenfalls aus der Blutbahn und ihre Zahl sinkt von ursprünglich $2,4 \times 10^3$ auf $0,81 \times 10^3$ (33 % des Ausgangswertes).

Die Zahl der B220⁻ und CD3⁻-Zellen, zu denen Granulozyten und Makrophagen gerechnet werden müssen, verringert sich auf 50 % des Ausgangswertes

4.1.1.3.2 AUSWIRKUNGEN AUF DIE OBERFLÄCHENMARKER

Somit wurde eine Änderung der absoluten Zellzahlen nachgewiesen. Interessant ist jedoch weiterhin, ob es auf diesen Zellen zu Veränderungen kommt. Es stellte sich die Frage, wie sich die untersuchten Membranproteine, die durch Antikörper angefärbt werden können, in ihrer Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe entwickeln. Membranproteine dienen

Zellen dazu, mit ihrer Umgebung in Kontakt zu treten, entweder um Signale zu empfangen, oder um selbst ein Signal zu geben. Als Antwort auf einen externen Stimulus können Zellen die Expression bestimmter Membranproteine entweder verstärken oder verringern, sodass eine quantitative Bestimmung dieser Proteine Aussagen über den jeweiligen Aktivitätszustand einer Zelle zulässt. Zur Quantifizierung wurde hierbei die „mean fluorescence intensity“ der Zellfärbung herangezogen.

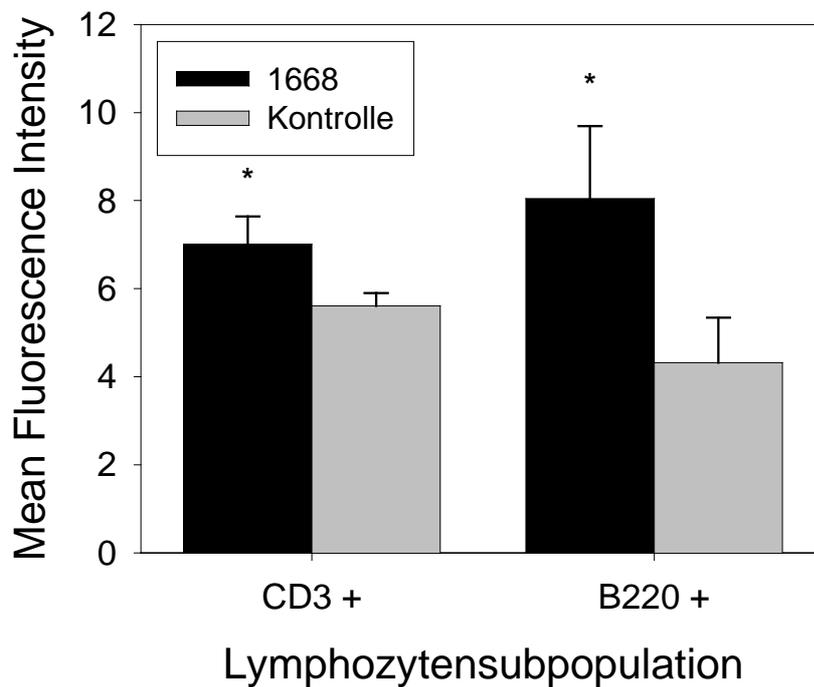


Abbildung 7: MFI von CD3⁺- und B220⁺-Zellen nach ip-Gabe 10 nmol 1668

C57/BL6-Mäusen (jeweils 5 pro Gruppe) wurde 10 nmol 1668 (in 100 μ l PBS) (schwarze Balken) bzw. 100 μ l PBS (graue Balken) streng steril intraperitoneal injiziert. Die Blutabnahme erfolgte 24 Stunden nach Injektion. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Mean Fluorescence Intensity (MFI) von Dreifachbestimmungen

* : signifikant unterschiedlich zu Kontrolle bei $p < 0,05$

Die Abbildung 7 zeigt, dass die Expression von CD3 und B220 auf den im Blut verbleibenden Zellen 24 Stunden nach Applikation von CpG-ODN signifikant höher ist als bei Blutlymphozyten von unbehandelten Mäusen.

4.1.1.4 Auswirkungen auf die Mac1- und Gr1-positiven Zellen

4.1.1.4.1 AUSWIRKUNGEN AUF DIE ZELLZAHL

Wie schon gezeigt verringert sich auch die Zahl der B220⁻/CD3⁻ Zellen im Blut. Zu diesen Zellen zählen Granulozyten und Makrophagen. Als Marker für diese Zellen dienen Oberflächenproteine, die mit den Antikörpern anti-Mac1 und anti-Gr1 angefärbt werden können.

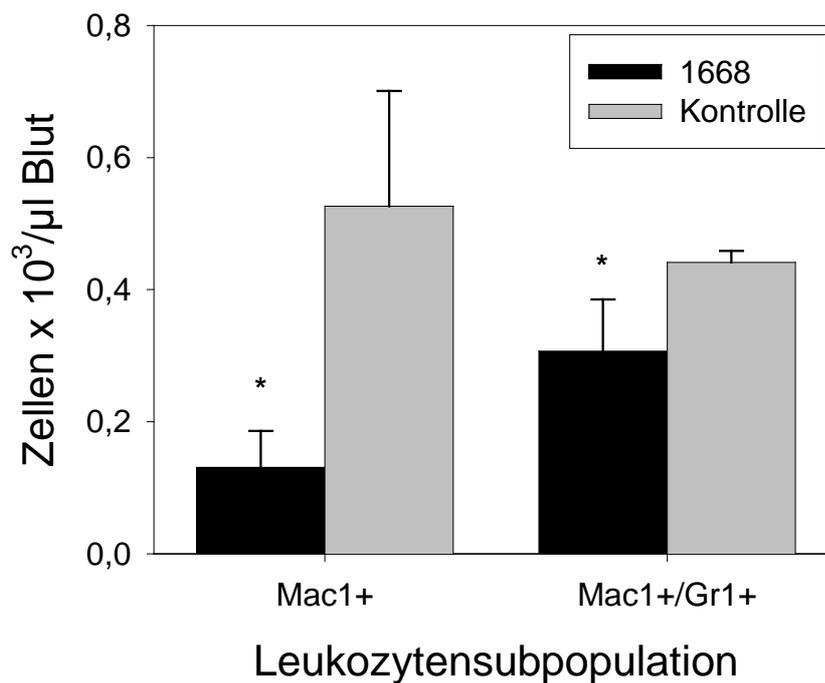


Abbildung 8: Lymphozytensubpopulationskinetik nach ip-Gabe 10 nmol 1668

C57/BL6-Mäusen (jeweils 5 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100 µl PBS) (schwarze Balken) bzw. 100 µl PBS (graue Balken) streng steril intraperitoneal injiziert. Die Blutabnahme erfolgte 24 Stunden nach Injektion. Prozentwerte wurden mittels FACS-Färbung bestimmt. Die erhaltenen Prozentwerte wurden mit den absoluten Zellzahlen der Leukozyten im Blut multipliziert und somit die absolute Zellzahl bestimmt

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Zellzahl von Dreifachbestimmungen

* : signifikant unterschiedlich zu Kontrolle bei $p < 0,05$

Die Zahl der Mac1-positiven Zellen im Blut nahm um 75 % ab. Die Zahl der Mac1/Gr1-doppelt-positiven Zellen im Blut verringert sich auf 70 % des Ausgangswertes (Abbildung 8).

4.1.1.4.2 AUSWIRKUNGEN AUF DIE OBERFLÄCHENMARKER

Wie bei den B220⁺- und CD3⁺-Zellen sollte nun beurteilt werden, wie sich die Expression der untersuchten Oberflächenmarker 24 Stunden nach Gabe des CpG-ODN verhält.

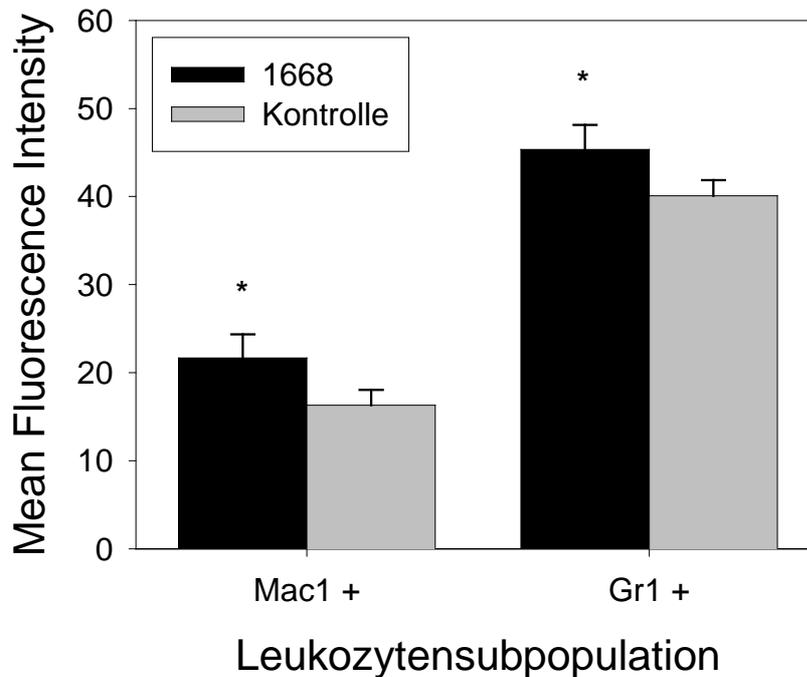


Abbildung 9: MFI von Mac1- und Gr1-positiven Zellen im Blut nach ip-Gabe 10 nmol 1668

C57/BL6-Mäusen (jeweils 5 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100 μ l PBS) (schwarze Balken) bzw. 100 μ l PBS (graue Balken) streng steril intraperitoneal injiziert. Die Blutabnahme erfolgte 24 Stunden nach Injektion. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Mean Fluorescence Intensity (MFI) von Dreifachbestimmungen

* : signifikant unterschiedlich zu Kontrolle bei $p < 0,05$

In der Abbildung 9 zeigt sich, dass es bei den Oberflächenmarkern Mac1 und Gr1 ebenfalls zu einer signifikanten Hochregulation der untersuchten Proteine kommt.

4.1.2 Einflüsse auf Thrombozyten

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind kernlose, scheibchenförmige Zellfragmente mit einem Durchmesser von 2-5 μm . Sie entstehen als Abschürungen großer vielkerniger Megakaryozyten des Knochenmarks. Ihre Anzahl im peripheren Blut beträgt zwischen 600 und 800×10^3 Zellen pro μl Blut. Ihre Zahl wird durch die Produktion im Knochenmark, durch Megakaryozyten, den Verbrauch bei der Blutgerinnung und weiteren Prozessen bestimmt. Produktion und Verbrauch sind von mehreren Faktoren abhängig. Entzündungsprozesse haben auf die Zahl der Thrombozyten im peripheren Blut einen wesentlichen Einfluss.

Ihre Hauptfunktion entfalten Thrombozyten im Bereich des zellulären Anteils der Blutgerinnung.

Um die Thrombozytenzahl im peripheren Blut zu bestimmen, muss nach Abnahme das Blut ungerinnbar gemacht werden, da der Kontakt mit Fremdoberflächen zu einer sofortigen Gerinnung führen würde. Durch Überführen des Blutes in Heparin- oder EDTA-beschichtete Gefäße kann eine Gerinnung verhindert werden.

4.1.2.1 Effekte auf die Thrombozytenzahl

Nach Gabe von ODN wurde der Verlauf der Anzahl der zirkulierenden Thrombozyten über einen Zeitraum von 12 Tagen verfolgt.

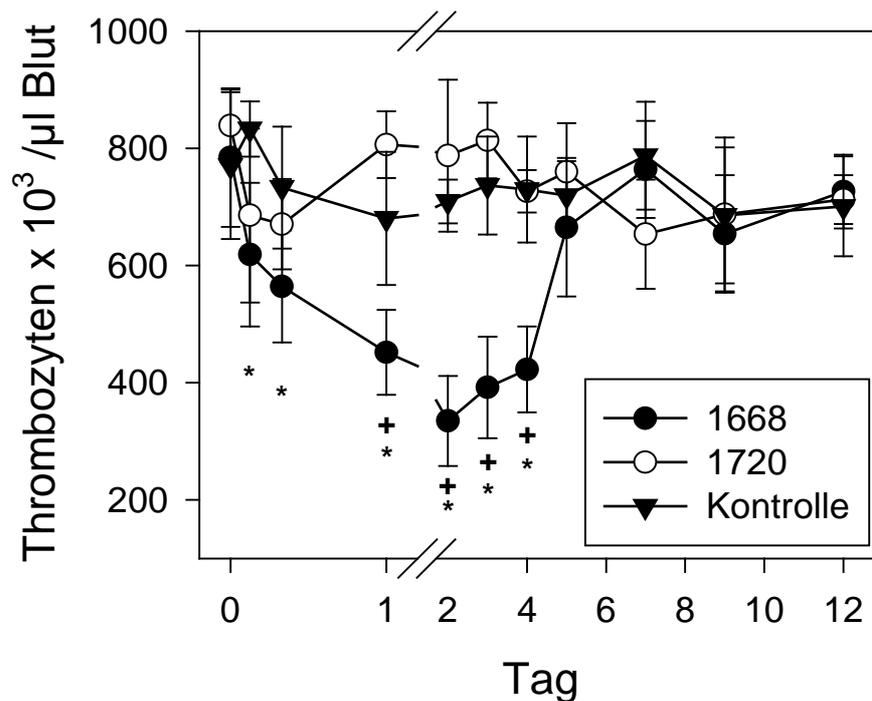


Abbildung 10: Thrombozytenkinetik nach ip-Gabe von ODN

C57/BL6-Mäusen (jeweils 5 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100 µl PBS) (schwarze Punkte), 10 nmol 1720 (in 100µl PBS) (weiße Punkte) und 100 µl PBS streng steril intraperitoneal injiziert. Die erste Blutabnahme erfolgte vor Injektion, weitere nach 3 Stunden, 8 Stunden sowie zu den angegebenen Zeitpunkten.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Thrombozytenzellzahl von Fünffachbestimmungen.

* : signifikant unterschiedlich zu Kontrolle bei $p < 0,05$

+ : signifikant unterschiedlich zu 1720 bei $p < 0,05$

Bereits nach drei Stunden ist ein Absinken der Thrombozyten zu verzeichnen (Abbildung 10). Dieser Abfall erreicht seinen Tiefpunkt an Tag 2 nach Verabreichung des ODNs und an Tag 5 befindet sich die Thrombozytenzahl wieder auf dem Ausgangsniveau. An Tag 2 ist somit die

Zahl von durchschnittlich 784×10^3 Zellen auf 334×10^3 pro Mikroliter Blut gesunken (42 % des Ausgangswertes).

4.1.2.2 Effekte auf die Thrombozytenzahl in TNFR(p55)^{-/-} - Mäusen

Es stellte sich die Frage, welche Faktoren für diesen raschen Abfall der Blutplättchen verantwortlich sind. Lipford et al. wiesen nach, dass es in der frühen Phase nach Injektion von 1668 zu einer starken TNF Ausschüttung kommt (Lipford et al., 1997). 1998 hatten Sinaldi et al. herausgefunden, dass im Wesentlichen TNF zu einer Thrombozytopenie durch Blutplättchenverbrauch führt (Sinaldi and Piguet, 1998). Tacchini-Cottier et al zeigten weiterhin, dass Mäuse, denen der TNF-Rezeptor1 (p55) fehlte, keinen Abfall der Thrombozyten aufwiesen (Tacchini-Cottier et al., 1998). In dieser Arbeit sollte die TNF-abhängigkeit des Thrombozytenabfalls untersucht werden. Hierfür wurden TNFR(p55)^{-/-}-Mäuse mit 10 nmol 1668 behandelt und ihre Thrombozytenzahl über einen Zeitraum von 12 Tagen verfolgt.

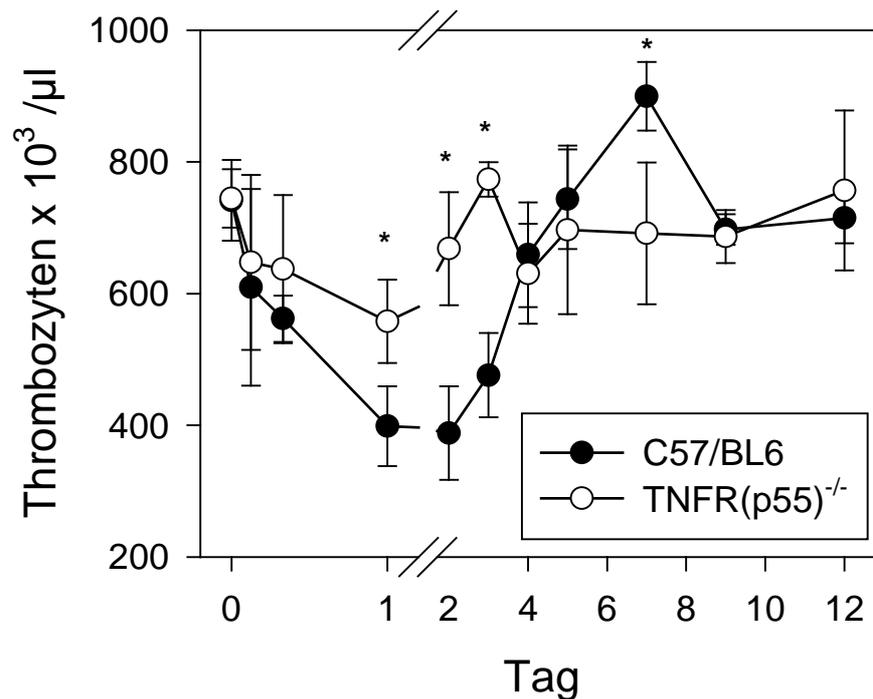


Abbildung 11: Thrombozytenkinetik nach ip-Gabe von CpG-ODN:

Vergleich C57/BL6-Wildtyp- vs. TNFR(p55)^{-/-}-Mäuse

C57/BL6-Mäusen (schwarze Punkte) und TNFR(p55)^{-/-}-Mäuse (weiße Punkte) (jeweils 5 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100 µl PBS) streng steril intraperitoneal injiziert. Die erste Blutabnahme erfolgte vor Injektion, weitere nach 3 Stunden, 8 Stunden sowie zu den angegebenen Zeitpunkten.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Thrombozytenzellzahl von Fünffachbestimmungen

* : signifikant unterschiedlich zu TNFR(p55)^{-/-} Maus bei $p < 0,05$

Hier zeigte sich bei den C57/BL6-Wildtyp-Mäusen ein schon oben als typisch beschriebener Abfall der Thrombozyten nach Gabe von 1668. Anders verhielt es sich jedoch bei den TNFR(p55)^{-/-}-Mäusen. Bei ihnen wurde ein kurzfristiger Abfall 24 Stunden nach Injektion registriert. Dieser Effekt erwies sich als signifikant unterschiedlich zu den Thrombozytenzahlen vor Injektion des ODNs. Jedoch war dieser Abfall auch signifikant geringer zu der Zellzahl, die bei C57/BL6 Wildtypmäusen gemessen wurde.

Somit zeigte sich ein Einfluss von TNF auf den Thrombozytenabfall. In einem weiteren Experiment sollte nun untersucht werden, ob es ebenso einen Effekt auf die Leukozytenzahlen gibt.

Deshalb wurde bei den TNFR(p55)^{-/-}-Mäusen die Entwicklung der Leukozytenzahlen bei diesem Experiment verfolgt.

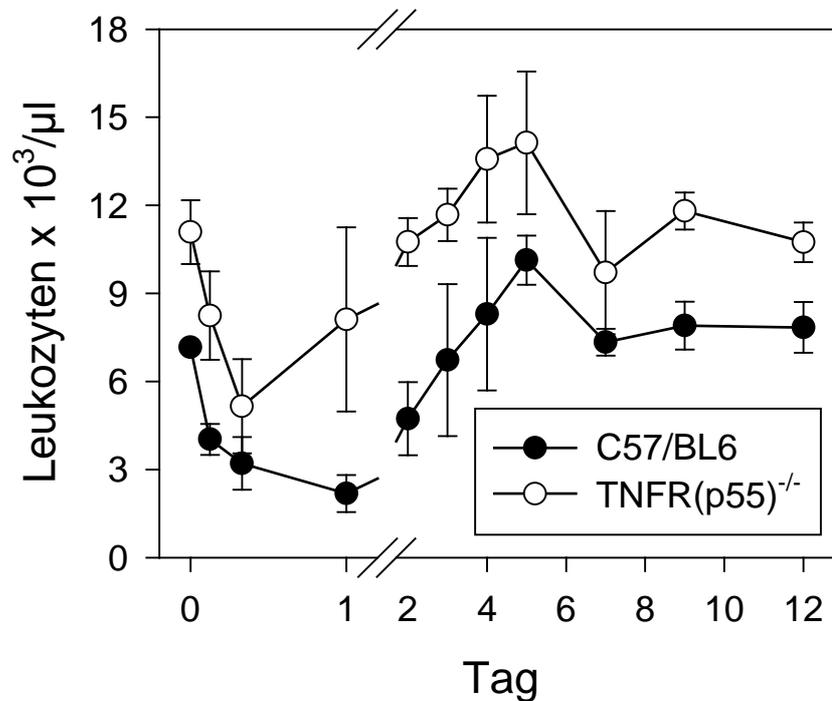


Abbildung 12: Lymphozytenkinetik nach ip-Gabe von CpG-ODN:

Vergleich C57/BL6-Wildtyp- vs. TNFR(p55)^{-/-}-Mäuse

C57/BL6-Mäusen (schwarze Punkte) und TNFR(p55)^{-/-}-Mäusen (weiße Punkte) (jeweils 5 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100µl PBS) streng steril intraperitoneal injiziert. Die erste Blutabnahme erfolgte vor Injektion, weitere nach 3 Stunden, 8 Stunden sowie zu den angegebenen Zeitpunkten.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Leukozytenzellzahl von Fünffachbestimmungen

Wie in Abbildung 12 zu sehen, kommt es in beiden Versuchsgruppen zu einem Abfall der Leukozytenzahlen. Beide Kurven verlaufen parallel. Jedoch ist bei den TNFR(p55)^{-/-} Mäusen grundsätzlich eine höhere Ausgangskonzentration von Leukozyten im Blut vorhanden. (7 x 10³ /µl Blut bei C57/BL6-Mäusen und 11 x 10³ bei TNFRp(55)^{-/-} Mäusen) und somit ist deren Leukozytenkurve um 3-4 x 10³ Zellen pro µl Blut nach oben verschoben.

4.2 Effekte der CpG-DNA auf Lymphknoten

Es hatte sich bis dato gezeigt, dass Blutzellen in kurzer Zeit nach Gabe von CpG-ODN die Blutbahn in großer Zahl verlassen. Es stellt sich somit die Frage, was mit diesen Zellen geschieht. Da es sich bei Leukozyten um Zellen des Immunsystems handelt, bestand eine mögliche Erklärung in der Tatsache, dass bei diesen Zellen Wanderungsbewegungen ausgelöst werden und sie sich nach Verlassen der Blutbahn in lymphatischem Gewebe ansammeln. Zu diesem Gewebe zählen im Wesentlichen die Lymphknoten, Milz und die Peyer-Plaques im Darm. Lymphatisches Gewebe wird aber auch in vielen anderen Regionen des Körpers gefunden, wie dem Waldeyerschen Rachenring, im Pharynx oder im Appendix. Für eine Untersuchung des lymphatischen Gewebes boten sich vor allem die Milz und leicht zu gewinnende periphere Lymphknoten in Kniekehle und Leiste an. Lymphknoten liegen immer im Verlauf von Lymphgefäßen, d.h. sie haben zuführende und abführende Lymphgefäße. Die Lymphknoten werden ebenfalls von einer Arterie und einer Vene versorgt. Beim Durchfluss der Lymphe wird diese von Schad- und Fremdstoffen gereinigt. Außerdem treten im Lymphknoten Lymphozyten aus dem Gewebe in die Strombahn ein oder aus der Strombahn ins Gewebe zurück.

Da es sowohl bei einer intraperitonealen als auch bei einer Injektion in den Fuß zu einer Leukopenie im Blut kam, sollte zwischen Auswirkungen auf die peripheren nicht drainierenden Lymphknoten und die direkt drainierenden Lymphknoten unterschieden werden.

4.2.1 Auswirkungen auf die peripheren nicht drainierenden Lymphknoten

4.2.1.1 Effekte auf die Zellzahl

Um die Vermutung einer generalisierten Reaktion zu bestätigen, wurden Mäuse wiederum mit 10 nmol 1668 und 10 nmol 1720 als Kontrolle intraperitoneal injiziert und danach die inguinalen und poplitealen Lymphknoten entfernt. Diese Lymphknoten drainieren keine Lymphflüssigkeit aus dem Bauchraum und nehmen somit nicht an einer lokalen Reaktion aus

dem Verteilungsraum des injizierten ODN teil. Diese vier Lymphknoten wurden zusammen weiterverarbeitet, in Einzelzellsuspensionen aufgetrennt und dann in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Entwicklungen in peripheren Lymphknoten wurden über einen Zeitraum von 15 Tagen verfolgt

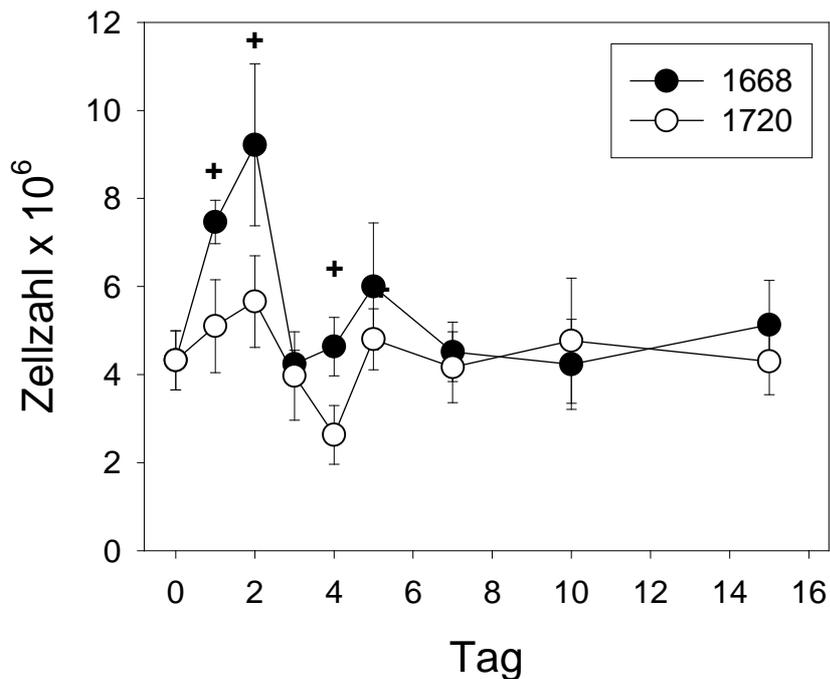


Abbildung 13: Zellzahl in peripheren Lymphknoten nach ip-Gabe von CpG-ODN

C57/BL6-Mäusen (jeweils 5 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100 µl PBS) (schwarze Punkte) bzw. 10 nmol 1720 (in 100 µl PBS) (weiße Punkte) streng steril intraperitoneal injiziert. Die erste Entnahme der inguinalen und poplitealen Lymphknoten erfolgte vor Injektion, weitere zu den angegebenen Zeitpunkten.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Leukozytenzellzahl von Fünffachbestimmungen.

+ : signifikant unterschiedlich zu 1720 bei $p < 0,05$

Die Abbildung 13 zeigt, dass die Verabreichung von 1668 zu einem Anstieg der Zellzahl in den peripheren Lymphknoten führt. Am ersten Tag nach Gabe von 10 nmol 1668 kommt es zu einem Anstieg der Zellzahlen in den poplitealen und inguinalen Lymphknoten um 72 % (von $4,32 \times 10^6$ Zellen auf $7,47 \times 10^6$ Zellen). Einen Tag später erreicht die Zellzahl im Lymphknoten mit $9,21 \times 10^6$ den Maximalpunkt um am dritten Tag später wieder auf das Ausgangsniveau zurückzufallen

4.2.1.2 Auswirkungen auf Lymphozytensubpopulationen

Lymphknoten bestehen im Normalfall zu mehr als 97 % aus Lymphozyten. Die restlichen Zellen verteilen sich auf Bindegewebs- und Endothelzellen, die im Wesentlichen die Architektur der Lymphknoten aufrecht erhalten. Weiterhin sind im Lymphknoten einige Makrophagen sowie Granulozyten zu finden.

Die Hauptpopulation der Lymphozyten teilt sich nun, wie schon oben erwähnt, weiter in T – und B-Lymphozyten auf. Hierbei ist zu beachten, dass im normalen Mauslymphknoten der Anteil der T-Lymphozyten bei ca. 65 % und der Anteil der B-Lymphozyten bei ca. 35 % liegt.

Im Folgenden wird die Entwicklung der beiden großen Subpopulationen der Lymphknoten nach Behandlung mit den ODNs 1668 und 1720 über einen Zeitraum von 12 Tagen dargestellt. Hierzu wurden die Zellen mit anti-B220 und anti-CD3-Antikörpern markiert und deren prozentualer Anteil mit der absoluten Zellzahl multipliziert.

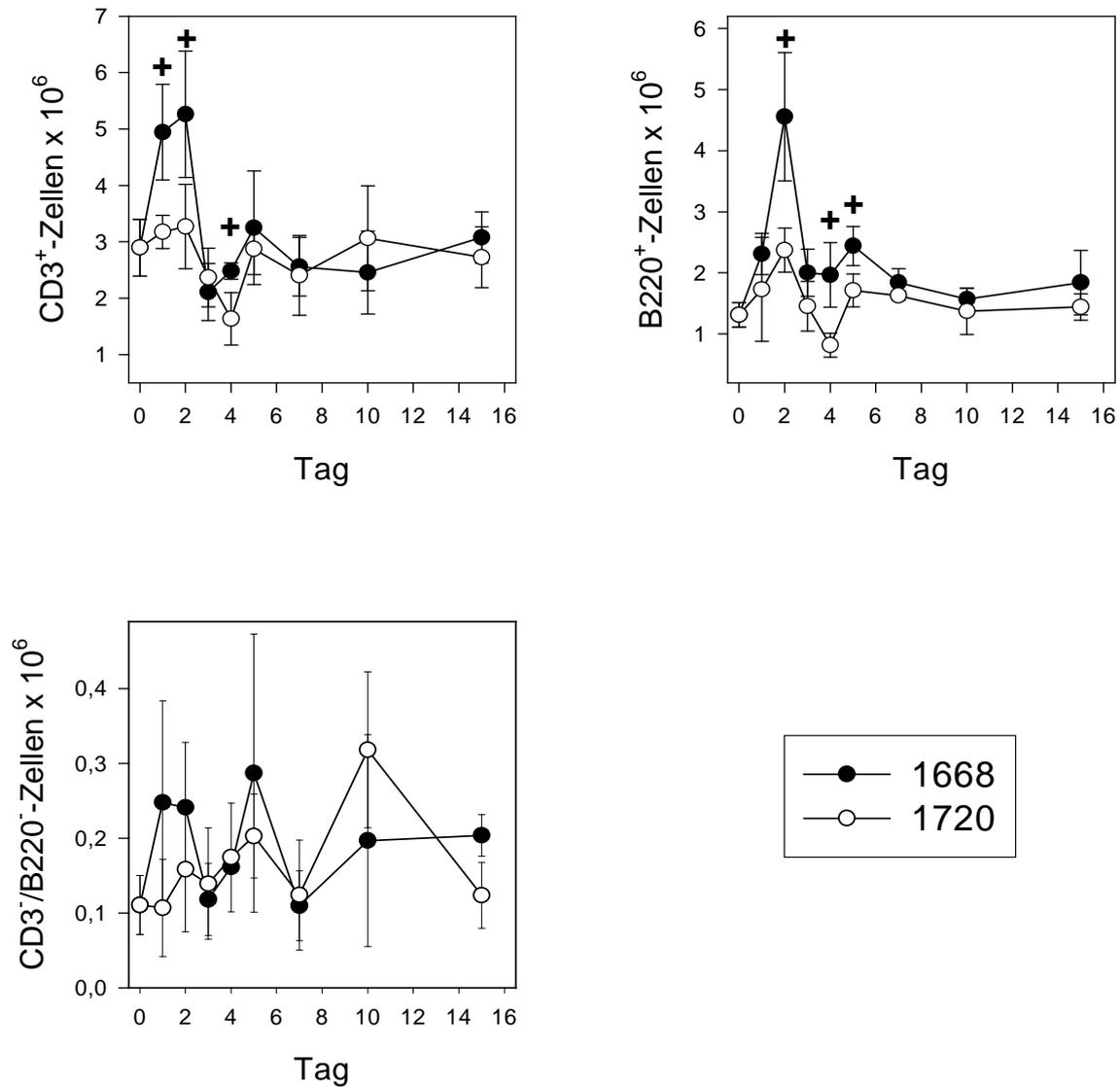


Abbildung 14: Lymphozytenkinetik von CD3⁺-, B220⁺- und CD3⁺/B220⁻- Zellen in peripheren Lymphknoten nach ip-Gabe von ODN

C57/BL6-Mäusen (jeweils 3 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100 µl PBS) (schwarze Symbole) bzw. 10 nmol 1720 (in 100µl PBS) (weiße Symbole) streng steril intraperitoneal injiziert. Die erste Entnahme der inguinalen und poplitealen Lymphknoten erfolgte vor Injektion., weitere Entnahmen erfolgten zu den angegebenen Zeitpunkten.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Leukozytenzellzahl von Dreifachbestimmungen.

+ : signifikant unterschiedlich zu 1720 bei p < 0,05

Bei den CD3⁺-Zellen kommt es am ersten Tag nach Injektion zu einem Anstieg der Zellzahl in den gepoolten peripheren Lymphknoten von $2,9 \times 10^6$ Zellen auf $4,9 \times 10^6$ an Tag 1 und $5,3 \times 10^6$ an Tag 2. Am dritten Tag erreichen die Zellzahlen wieder die Ausgangswerte vor der Injektion.

Bei den B220⁺-Zellen steigt die Zellzahl von $1,31 \times 10^6$ auf $2,31 \times 10^6$ am Tag 1 und $4,56 \times 10^6$ am zweiten Tag nach Injektion des ODNs. Die Zellzahl bleibt gegenüber dem Ausgangswert bis Tag 5 leicht erhöht und nimmt dann wieder Werte wie vor der Injektion an.

Bei den CD3⁻/B220⁻ Zellen sind im peripheren Lymphknoten keine Veränderungen zu beobachten.

Die Veränderung der absoluten Zellzahlen der CD3⁺-oder B220⁺-Zellen ist ein Produkt aus Veränderung der Zellzahl in peripheren Lymphknoten und der Veränderung der prozentualen Anteile der Subpopulationen in denselben. In diesem Zusammenhang soll nun dargestellt werden wie eine Injektion von ODNs die Zusammensetzung des Lymphknotens beeinflusst.

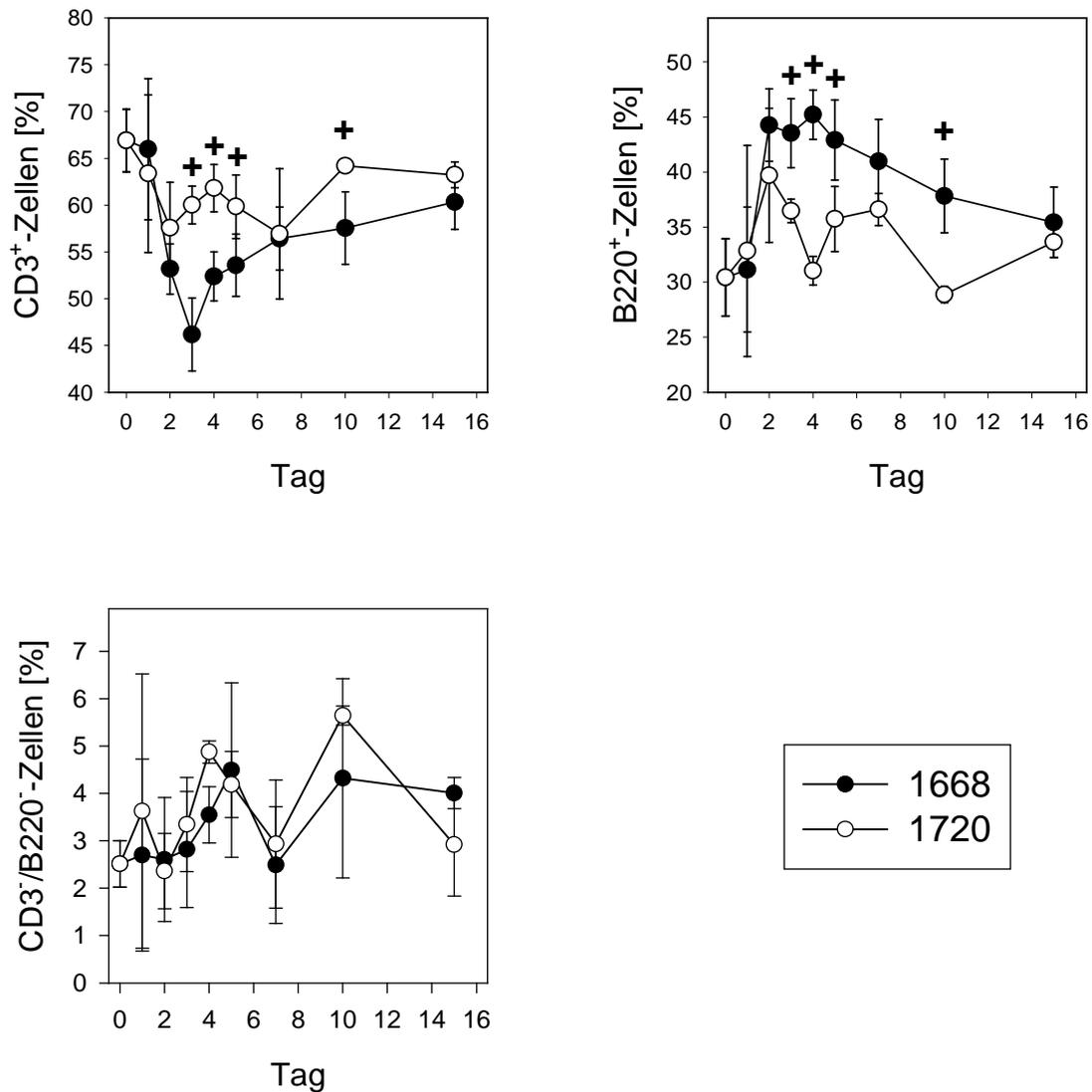


Abbildung 15: prozentuale Verteilung von CD3⁺-, B220⁺- und CD3⁻/B220⁻-Zellen in peripheren Lymphknoten nach ip-Gabe von ODN

C57/BL6-Mäusen (jeweils 5 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100 µl PBS) (schwarze Symbole) bzw. 10 nmol 1720 (in 100 µl PBS) (weiße Symbole) streng steril intraperitoneal injiziert. Die erste Entnahme der inguinalen und poplitealen Lymphknoten erfolgte vor Injektion, weitere zu den angegebenen Zeitpunkten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Leukozytenzellzahl von Fünffachbestimmungen. + : signifikant unterschiedlich zu 1720 bei p < 0,05

Die Injektion des ODNs 1668 führt zu einer Veränderung der Zusammensetzung der peripheren Lymphknoten (Abbildung 15). Hierbei handelt es sich um eine prozentuale Zunahme der B220⁺- sowie reziprok zu einer prozentualen Abnahme der CD3⁺-Zellen v. a. in

den Tagen 2 bis 5 nach Injektion von 1668. Danach nähern sich die Prozentzahlen der untersuchten Zellen wieder denjenigen der Ausgangswerte an.

Ebenso wie schon bei den absoluten Zellzahlen zu beobachten kommt es zu keinen signifikanten Veränderungen in den prozentualen Anteilen der CD3⁺/B220⁻-Zellen.

4.2.2 Auswirkungen auf die drainierenden Lymphknoten

4.2.2.1 Effekte auf die Zellzahl

In Abbildung 2 wurde gezeigt, dass eine Injektion von 5 nmol 1668 in die Fußsohle ebenso so wie eine intraperitoneale Injektion von 10 nmol 1668 zu einer passageren Leuko- und Thrombozytopenie führt. Nun sollte weiter untersucht werden, inwiefern eine lokale Injektion in einen Fuß einen Einfluss auf die Zellzahl im direkt drainierenden Lymphknoten ausübt. Lipford et al. hatten gezeigt, dass es bei dem oben genannten Injektionsschema zu einer starken Zellvermehrung im drainierenden Lymphknoten kommt. Dieses Ergebnis sollte verifiziert werden und als Kontrolle das ODN 1720 verwendet werden. Weiterhin wurden bei diesen Versuchen auch an den Tagen 1 und 2 die poplitealen Lymphknoten untersucht. Hierzu wurde Mäusen 5 nmol 1668 bzw. 1720 in den rechten Fuß injiziert.

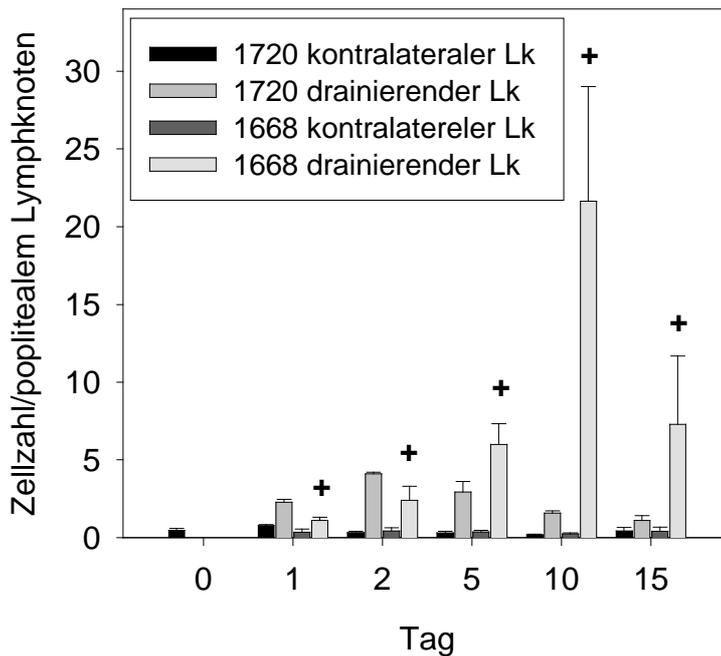


Abbildung 16: Zellzahl im drainierenden poplitealen Lymphknoten nach lokaler-Gabe von CpG-ODN in den rechten Fuß

C57/BL6-Mäusen (jeweils 3 pro Gruppe) wurden 5 nmol 1668 (in 50µl PBS) bzw. 50 nmol 1720 (in 50µl PBS) streng steril in den rechten Fuß injiziert. Die erste Entnahme des poplitealen Lymphknotens im drainierenden bzw. kontralateralen Bein erfolgte vor Injektion, weitere zu den angegebenen Zeitpunkten.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Leukozytenzellzahl von Dreifachbestimmungen.

+ : signifikant unterschiedlich zu dem mit 1720 behandelten poplitealen Lymphknoten bei $p < 0,05$

Abbildung 16 zeigt, dass es nach Gabe von 5 nmol 1668 in den rechten Fuß zu einer Verdoppelung der Zellzahl im drainierenden poplitealen Lymphknoten nach 24 Stunden kommt. Die Zellzahl steigt in den folgenden Tagen weiter stark an und erreicht an Tag 10 mit $21,6 \times 10^6$ Zellen ihr Maximum. Dies entspricht einer Steigerung gegenüber dem Ausgangswert um das 47-fache. Wie in der Abbildung ebenfalls zu sehen ist, hat auch die Gabe des Kontroll-ODNs 1720 einen Einfluss auf die Zellzahl. Dieser Effekt (Maximum an Tag 2 mit $4,1 \times 10^6$ Zellen) ist in den ersten beiden Tagen nach Injektion stärker ausgeprägt als bei den mit 1668 behandelten Mäusen und unterscheidet sich auch signifikant von diesen. Im kontralateralen Lymphknoten konnten in beiden Gruppen keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

4.2.2.2 Auswirkungen auf Lymphozytensubpopulationen

Wie oben bereits, erwähnt bestehen Lymphknoten zu 97 % aus Lymphozyten. Ebenso sollte wie bereits bei den peripheren nicht drainierenden Lymphknoten die Entwicklung der Lymphozyten im direkt drainierenden Lymphknoten untersucht werden.

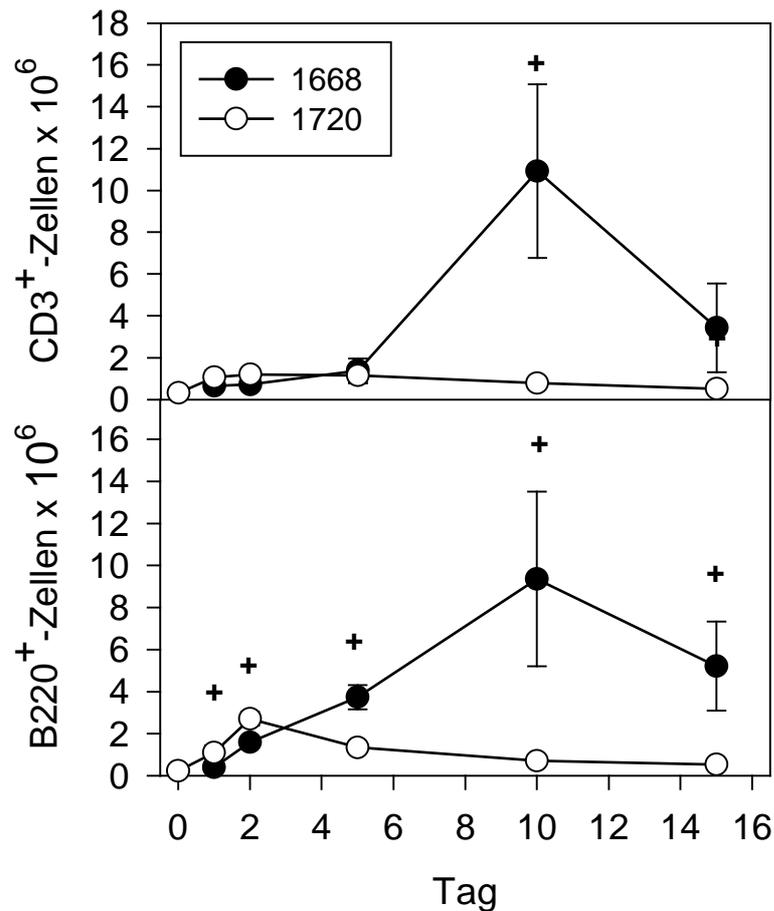


Abbildung 17: Zahl von CD3⁺- bzw. B220⁺-Zellen im drainierenden poplitealen Lymphknoten nach lokaler Gabe von ODN in den rechten Fuß

C57/BL6-Mäusen (jeweils 3 pro Gruppe) wurden 5 nmol 1668 (in 50 µl PBS) bzw. 50 nmol 1720 (in 50 µl PBS) streng steril in den rechten Fuß injiziert. Die erste Entnahme des poplitealen Lymphknoten im drainierenden Bein erfolgte vor Injektion, weitere zu den angegebenen Zeitpunkten.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Leukozytenzellzahl von Dreifachbestimmungen.

+ : signifikant unterschiedlich zu dem mit 1720 behandelten poplitealen Lymphknoten bei $p < 0,05$

Bei den Hauptpopulationen im Lymphknoten, CD3⁺- und B220⁺-Zellen, kommt es zu einer starken Zunahme beider Zellgruppen. Der Anstieg in der B220⁺-Gruppe verläuft hingegen rascher als bei den CD3⁺-Zellen. Hierbei ist bei den B220⁺-Zellen, wie schon bei den absoluten Zellzahlen zu beobachten war, ein schnellerer Anstieg bei den mit 1720 behandelten Mäusen mit Gipfel an Tag 2 zu verzeichnen (Abbildung 17).

4.3 Effekte von CpG-DNA auf die Milz

Wie oben bereits erwähnt zählt die Milz ebenfalls zu den Organen des lymphatischen Systems. Sie ist das größte Lymphorgan des Körpers. Im Gegensatz zu den Lymphknoten, die in der Lymphbahn liegen, ist die Milz in den Blutkreislauf eingeschaltet und wirkt hier als Filter. Ihre Aufgaben liegen in der Infektabwehr und dem Abbau von roten und weißen Blutkörperchen. Außerdem werden in die Blutbahn eingedrungene Fremdkörper, z. B. Mikroorganismen, von den in der Milz in großer Zahl vorhandenen phagozytierenden Zellen gebunden und abgebaut. Antigene, die ungebunden im Blut zirkulieren, z. B. Toxine von Mikroorganismen, führen zur Bildung von Antikörpern. Die Milz ist wie andere lymphatische Organe befähigt, aktivierte Lymphozyten zu produzieren und diese in die Blutbahn abzugeben. Bei Mäusen kann es zusätzlich zu einer extramedullären Blutbildung in der Milz kommen.

4.3.1 Auswirkungen auf das Milzgewicht

Wie erwähnt handelt es sich bei der Milz um das größte Lymphorgan. So könnte es auch zu Verschiebungen der Zellen von der Blutbahn in die Milz durch eine Injektion von CpG-DNA kommen. Hierzu wurde als erster Parameter Veränderungen des Gewichtes der Milz in den Mäusen untersucht.

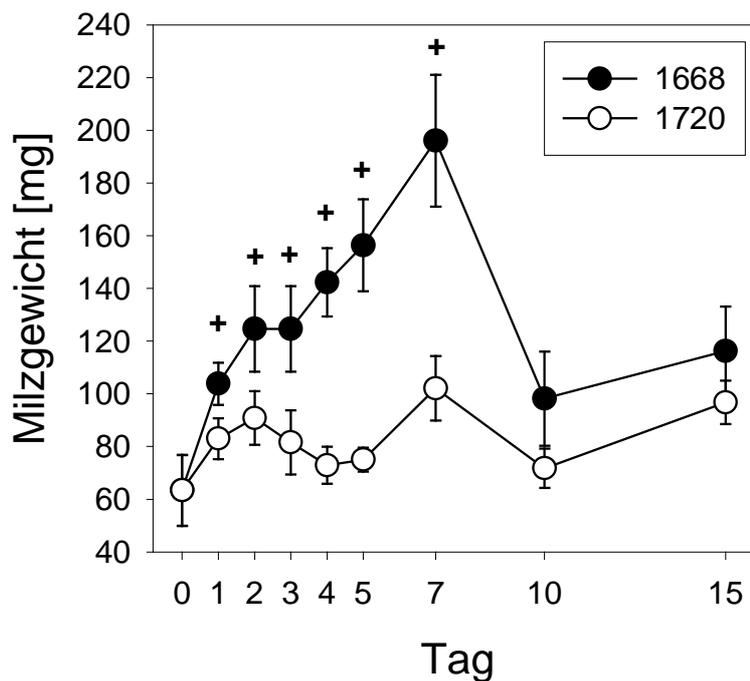


Abbildung 18: Entwicklung des Milzgewichtes nach Injektion von ODN

C57/BL6-Mäusen (jeweils 5 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100 μ l PBS) (schwarze Punkte) oder 10 nmol 1720 (in 100 μ l PBS) (weiße Punkte) streng steril intraperitoneal injiziert.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung des Milzgewichtes von Fünffachbestimmungen

+ : signifikant unterschiedlich zu 1720 bei $p < 0,05$

Wie in Abbildung 18 zu sehen kommt es schon 24 Stunden nach Injektion des ODNs 1668 zu einem Anstieg des mittleren Milzgewichtes von 63 mg auf 103 mg. Das Milzgewicht steigt weiter an und erreicht seinen Maximalwert an Tag 7 mit 196 mg. Danach nimmt das Gewicht wieder ab, bleibt jedoch in dem untersuchten Zeitraum von 15 Tagen über dem des Ausgangswertes.

4.3.2 Effekte auf die Zellzahl in der Milz

Es hatte sich bis dato gezeigt, dass das Milzgewicht sich nach Gabe von ODN stark erhöht. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob es auch zu Auswirkungen auf die Zellzahl in der Milz kommt. Da die Milz sehr stark durchblutet ist und im Wesentlichen interessant war, wie sich die kernhaltigen Zellen in der Milz entwickeln, wurden die Erythrozyten vor der Zählung der Zellen lysiert.

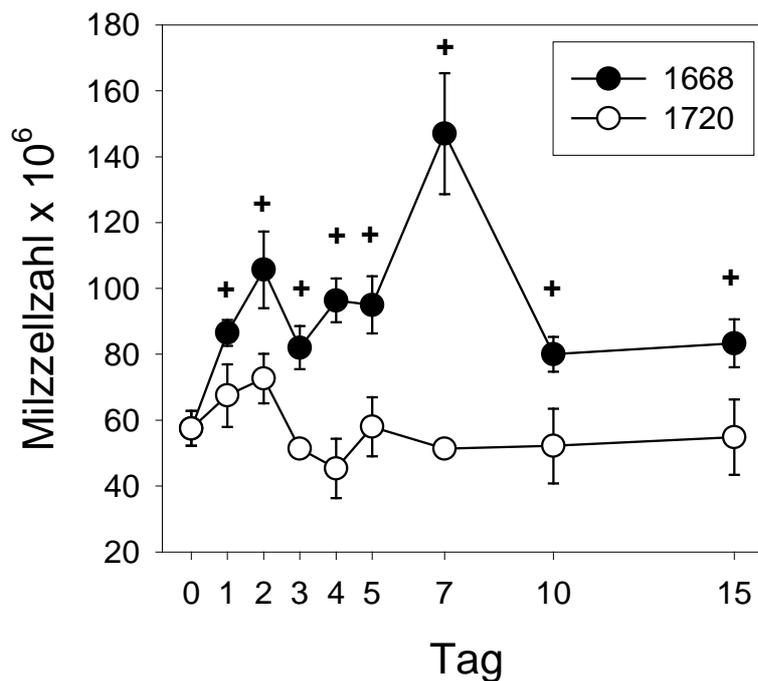


Abbildung 19: Entwicklung des Milzzellzahl nach Injektion von ODN

C57/BL6-Mäusen (jeweils 5 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100 μ l PBS) (schwarze Punkte) oder 10 nmol 1720 (in 100 μ l PBS) (weiße Punkte) streng steril intraperitoneal injiziert.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Milzzellzahl von Fünffachbestimmungen

+ : signifikant unterschiedlich zu 1720 bei $p < 0,05$

Abbildung 19 zeigt, dass die Entwicklung des Milzgewichtes, wie in Abbildung 18 dargestellt, auch ihren Niederschlag in der Entwicklung der Zellzahl in der Milz nach Lyse der Erythrozyten findet. Wie zu erkennen ist, erhöht sich die Zellzahl binnen 24 Stunden von 57×10^6 Zellen auf $86,5 \times 10^6$ Zellen. Bis zum Tag 5 pendeln sich die Werte um diesen Wert ein. Die maximale Zellzahl wird am Tag 7 mit 147×10^6 Zellen erreicht. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes bleibt die Zellzahl mit einem Wert von um die 80×10^6 Zellen immer noch leicht erhöht.

4.3.3 Effekte auf Leukozytensubpopulationen in der Milz

Die kernhaltigen Zellen, die in der Milz der Maus vorkommen, sind im Wesentlichen Leukozyten. Hiervon tragen ca. 60 % das B220-Antigen und ca. 35 % das CD3-Antigen. Die restlichen Zellen sind zum großen Teil Makrophagen bzw. Granulozyten.

Analog zu den Untersuchungen bei den Lymphknoten sollte nun die Entwicklung der CD3⁺- bzw. B220⁺-Zellen untersucht werden.

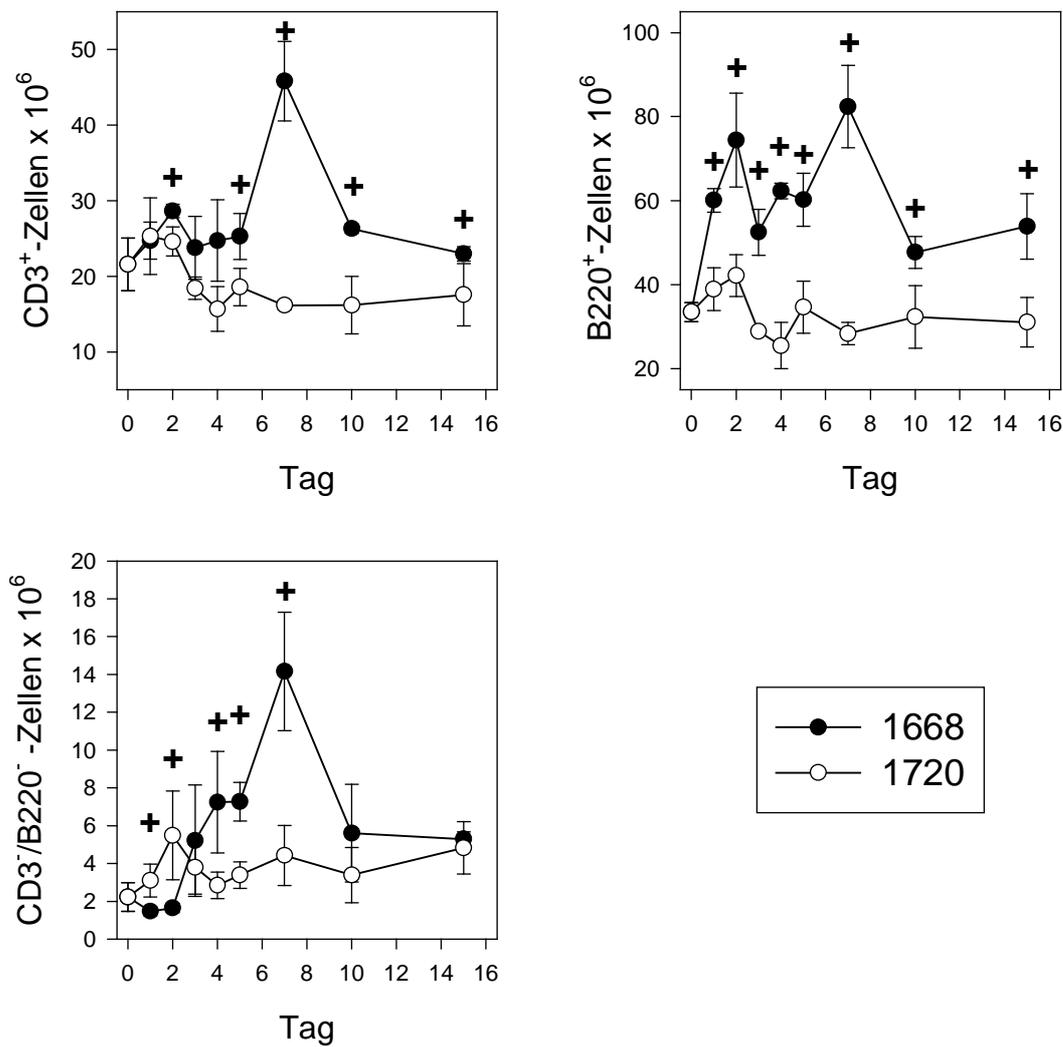


Abbildung 20: Lymphozytenkinetik von CD3⁺-, B220⁺- und CD3⁺/B220⁻-Zellen in der Milz nach ip-Gabe von ODN

C57/BL6-Mäusen (jeweils 3 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100 µl PBS) (schwarze Symbole) bzw. 10 nmol 1720 (in 100 µl PBS) (weiße Symbole) streng steril intraperitoneal injiziert

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Leukozytenzellzahl von Dreifachbestimmungen.

+ : signifikant unterschiedlich zu 1720 bei p < 0,05

Die Abbildung 20 zeigt, dass es bei den CD3⁺-Zellen bis zum Tag 5 nur zu einem leichten Anstieg der Zellzahl kommt. Analog zu der Entwicklung bei der absoluten Zellzahl in der Milz erreichen die CD3⁺ Zellen auch am Tag 7 ihre Maximalzahl und fallen bis zum Tag 15 wieder auf Werte ab, die sich um den Ausgangspunkt bewegen.

Die B220⁺-Zellen hingegen zeigen bereits am Tag 1 nach Injektion von 1668 einen Anstieg von $33,5 \times 10^6$ Zellen auf 60×10^6 Zellen. Die Zellzahl bleibt während des gesamten Beobachtungszeitraumes signifikant erhöht und erreicht ebenfalls, wie zuvor schon gesehen einen Maximalpunkt am Tag 7.

Die CD3⁻/B220⁻-Zellen zeigen nach Behandlung mit 1668 zunächst tendenziell einen leichten Abfall um dann stark anzusteigen und ebenfalls am Tag 7 ihr Maximum zu erreichen. Bei Behandlung mit 1720 kommt es an den ersten beiden Tagen zu einem signifikanten Anstieg der Zellzahl, die danach wieder auf Ausgangsniveau zurückkehrt.

Wie schon bei der Entwicklung der Zellzahl in den peripheren Lymphknoten erwähnt, ist die Veränderung der absoluten Zellzahl von CD3⁺- bzw. B220⁺-Zellen ein Produkt aus der Veränderung der Zellzahl in der Milz und der Veränderung des prozentualen Anteils der Subpopulationen in derselben.

Die folgende Abbildung 21 zeigt nun, wie sich eine Injektion von ODN auf die Verteilung der CD3⁺- und B220⁺-Zellen auswirkt.

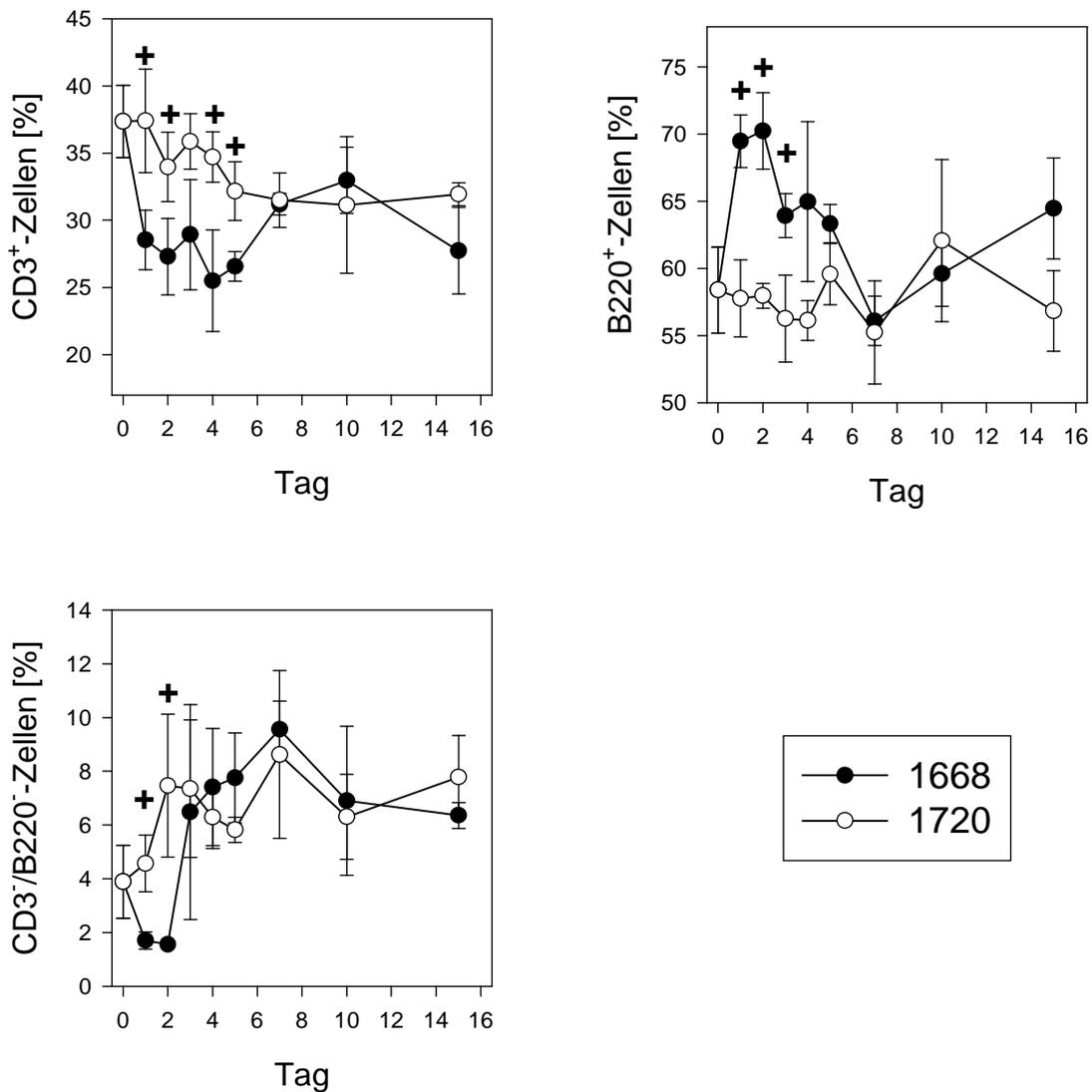


Abbildung 21: prozentuale Verteilung von CD3⁺, B220⁺ und CD3⁺/B220⁺-Zellen in der Milz nach ip-Gabe von ODN

C57/BL6-Mäusen (jeweils 3 pro Gruppe) wurden 10 nmol 1668 (in 100 µl PBS) (schwarze Symbole) bzw. 10 nmol 1720 (in 100 µl PBS) (weiße Symbole) streng steril intraperitoneal injiziert.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Zellzahl von Dreifachbestimmungen.

+ : signifikant unterschiedlich zu 1720 bei p < 0,05

Wie oben gezeigt kommt es zu einer starken prozentualen Abnahme der CD3⁺-Zellen und gleichzeitig zu einer Zunahme der B220⁺-Zellen vor allem in den Tagen 1 bis 4. Interessanterweise ist das Verhältnis der beiden Zellpopulationen am Tag 7, an dem bei den absoluten Zellzahlen die größte Veränderung zu sehen ist, wieder annähernd auf dem Ausgangsniveau.

Der Anteil der CD3⁺/B220⁺-Zellen zeigt in den ersten beiden Tagen nach Gabe des ODNs einen Abfall um 50 %.

4.4 Einfluss von CpG-DNA auf die Expression von Chemokinen

Da bekannt war, dass es zu einer Induktion von Chemokinen durch die Gabe von CpG-ODN kommen kann (Krug et al., 2003) und gleichzeitig bestimmte Chemokine eine entscheidende Rolle bei der Rezirkulation von Lymphozyten zwischen Blut und sekundären Lymphorganen spielen, sollte mittels der Reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR) die Expression der Chemokine ELC und SDF ermittelt werden. Diese beiden Chemokine spielen sowohl in der T-Zellmigration in sekundäre Lymphorgane sowie in B-Zellmigration in lymphatisches Gewebe eine wichtige Rolle und werden unter anderem in der Milz und den Lymphknoten exprimiert. Der Rezeptor für beide Chemokine ist auf naiven und reifen B- und T-Zellen vorhanden (Gunn et al., 1998; Kim und Broxmeyer, 1999).

Ein Mitarbeiter im Labor hatte bis dato gezeigt, dass es 24 Stunden nach ODN-Exposition zu einer Hochregulation des Chemokins ELC in Milz und peripheren Lymphknoten kommt.

Da die Leukozytenzahlen im Blut sich bereits 3 Stunden nach Injektion des ODNs signifikant verändern, wurde als Untersuchungszeitpunkt 2 Stunden nach Applikation des ODNs gewählt.

4.4.1 Einfluss auf die SDF-Expression

Da es zu Veränderungen der Zellzahl im Blut bereits nach 3 Stunden kommt und die Zellzahl in Lymphknoten und Milz sich nach 24 Stunden erhöht, sollte in diesen Organen die Expression von SDF ermittelt werden.

4.4.1.1 SDF-Expression in der Milz

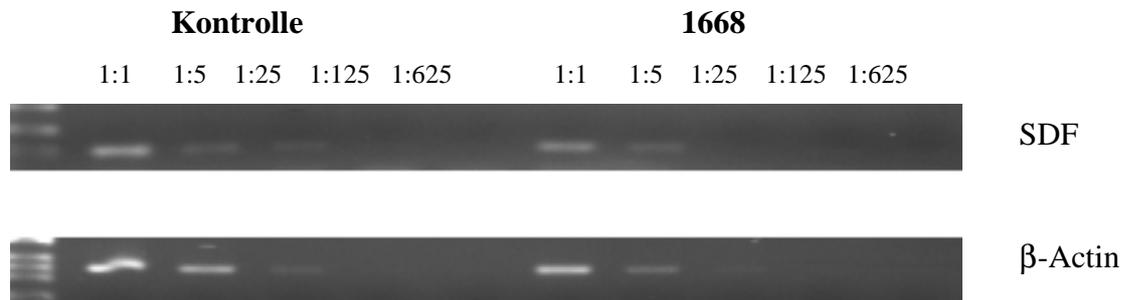


Abbildung 22: Semiquantitative PCR auf SDF in der Milz 2 Stunden nach ip-Gabe von CpG-ODN

Je einer C57/BL6-Maus wurde 10 nmol 1668 (in 100 µl PBS) bzw. 100 µl PBS streng steril intraperitoneal injiziert. Entnahme der Milz und Präparation der Zellen erfolgten 2 Stunden nach Injektion.

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist kommt es zu keiner erkennbaren Veränderung der Expression von SDF in der Milz 2 Stunden nach Gabe des ODNs 1668.

4.4.1.2 SDF-Expression im peripheren Lymphknoten

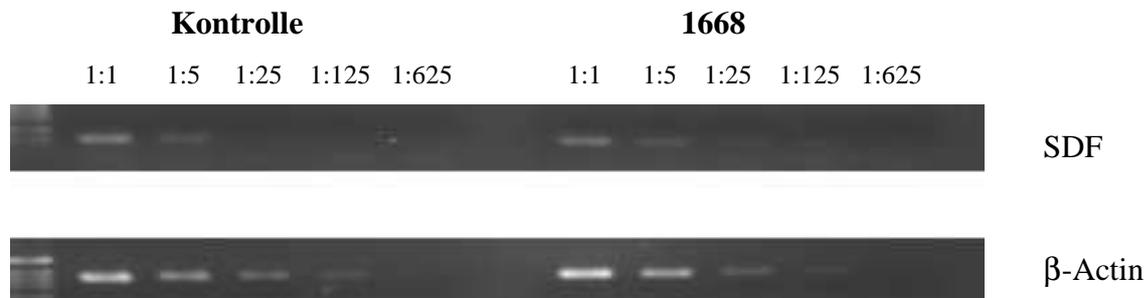


Abbildung 23: Semiquantitative PCR auf SDF in den peripheren Lymphknoten 2 Stunden nach ip-Gabe von CpG-ODN

Je einer C57/BL6-Maus wurde 10 nmol 1668 (in 100 µl PBS) bzw. 100 µl PBS streng steril intraperitoneal injiziert. Entnahme der peripheren Lymphknoten und Präparation der Zellen erfolgten 2 Stunden nach Injektion.

Auch in den peripheren Lymphknoten kommt es nach Gabe von CpG-ODN zu keiner erkennbaren Hochregulation von SDF.

4.4.2 Einfluss auf die ELC-Expression

Ein Mitarbeiter im Labor konnte zeigen, dass es 24 Stunden nach Gabe von 1668 zu einer Hochregulation der ELC-Expression im Lymphknoten und in der Milz kommt. Da wie oben bereits erwähnt der Leukozytenabfall im Blut bereits nach 3 Stunden beginnt, sollte auch die Expression von ELC zwei Stunden nach ODN-Expression untersucht werden.

4.4.2.1 ELC-Expression in der Milz



Abbildung 24: Semiquantitative PCR auf ELC in der Milz 2 Stunden nach ip-Gabe von CpG-ODN

Je einer C57/BL6-Maus wurde 10 nmol 1668 (in 100 μ l PBS) bzw. 100 μ l PBS streng steril intraperitoneal injiziert. Entnahme der Milz und Präparation der Zellen erfolgten 2 Stunden nach Injektion.

4.4.2.2 ELC-Expression in den peripheren Lymphknoten

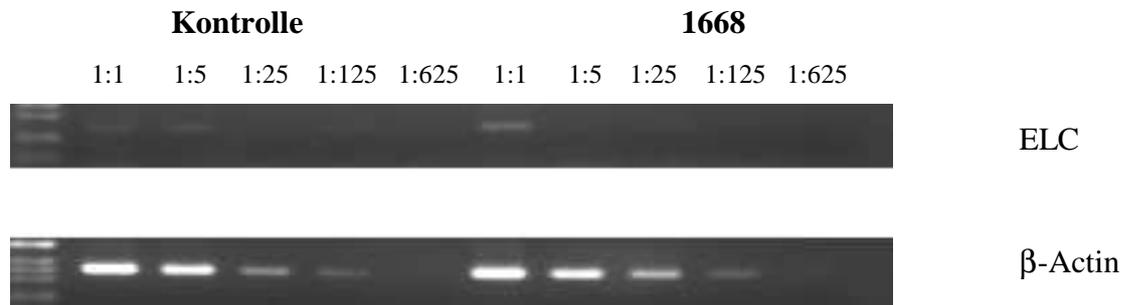


Abbildung 25: Semiquantitative PCR auf ELC in den peripheren Lymphknoten 2 Stunden nach ip-Gabe von CpG-ODN

Je einer C57/BL6-Maus wurde 10 nmol 1668 (in 100 μ l PBS) bzw. 100 μ l PBS streng steril intraperitoneal injiziert. Entnahme der peripheren Lymphknoten und Präparation der Zellen erfolgten 2 Stunden nach Injektion.

Wie in den beiden Abbildungen 24 und 25 zu sehen ist führt eine Gabe von 1668 nach zwei Stunden weder in der Milz noch in den peripheren Lymphknoten zu einem Anstieg der Expression.

5 DISKUSSION

5.1 CpG-DNA führt zu einer transienten Leukopenie im Blut

Eine Injektion von CpG-DNA führt zu einer transienten Leukopenie. Hierbei handelt es sich um einen Effekt, der bereits 3 Stunden nach Applikation der Substanz einsetzt. Die Leukozytenzahl erreicht nach 24 Stunden minimale Werte und kehrt nach drei Tagen wieder auf Ausgangswerte zurück.

2000 beobachteten Tousignant et al. einen ähnlichen Effekt, der bei der Verwendung von kationischen Lipid:Plasmid-DNA-Komplexen auftrat. Dies wurde als Vektortoxizität bei Dosen aufgefasst, die notwendig waren, um therapeutisch relevante Spiegel bei transgener Expression zu erreichen. Hierbei wurde eine dosisabhängige Entzündungsreaktion beschrieben, die unter anderem mit Komplementaktivierung, Thrombozytopenie und Induktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN, TNF α , IL-6 und IL-12 einhergeht (Tousignant et al., 2000). Lipford et al. beschrieben 1997, dass CpG-Motive ebenfalls zu einer Induktion dieser Zytokine führen können (Lipford et al., 1997). Somit liegt der Schluss nahe, dass es sich bei der beschriebenen Leukopenie um eine zytokinvermittelte Antwort auf die Gabe von CpG-DNA handeln kann. Zudem ist bekannt, dass IFN zu einer transienten Leukopenie im Blut führen kann (Gresser et al., 1981). Interferon hat in dieser Hinsicht starken Einfluss auf die Lymphozyten (Kawasaki et al., 1986).

Von dem Abfall der Zellen im Blut sind alle Fraktionen der Leukozyten betroffen.

Lymphozyten bilden mit etwa 75 % den Hauptanteil der Leukozyten bei C57/BL6-Mäusen und sind somit auch hauptverantwortlich für die beschriebenen Zellveränderungen. Bei den Lymphozyten sollte noch weitergehend in Wirkungen auf T- und B-Zellen unterschieden werden. Hierbei zeigte sich, dass es prozentual zu einem stärkeren Abfall der B-Zellen im Vergleich zu den T-Zellen kam. Ursache für dieses Phänomen könnte eine direkte Aktivierung der B-Zellen durch CpG-ODN sein, das neben einer vermehrten Proliferation und Bildung von Immunglobulinen (Krieg et al., 1995) ebenfalls B-Zellen vermehrt anregt, die Blutbahn zu verlassen.

Die Kinetik der Granulozyten zeigte nach 3 Stunden einen signifikanten Anstieg, der Zellzahlen im Blut um nach 24 Stunden ebenfalls abzufallen. Im Differentialblutbild kommt es 8 Stunden nach Gabe der DNA zu einer starken prozentualen Zunahme der Granulozyten von ca. 20 % auf 50 %. Ursache für diesen kurzfristigen Anstieg könnte eine Mobilisation von Granulozyten aus anderen Kompartimenten wie den randständigen Zellen oder dem Reserveanteil der Granulozyten im Knochenmark sein. Andere Mitarbeiter aus dem Labor konnten zeigen, dass es nach Gabe von CpG-DNA zu einer Verarmung des Knochenmark mit reifen Granulozyten kommt (Daten in Veröffentlichung). Ungeklärt bleibt hingegen wie CpG-DNA auf neutrophile Granulozyten wirkt. Zwar ist bekannt, dass im humanen System Granulozyten den TLR9-Rezeptor besitzen, es aber bei Gabe von CpG-DNA es zu keiner Aktivierung der Granulozytenfunktion kommt. Allerdings führt eine Vorbehandlung mit Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) zu einer Hochregulation von TLR9 und zu einer Aktivierung und verbesserten Funktion von Granulozyten (Hayashi et al., 2003). Andere Autoren konnten eine Aktivierung von humanen Neutrophilen durch bakterielle DNA nachweisen. Dieser Effekt erwies sich aber als unabhängig von einer Aktivierung des TLR9 durch CpG-DNA (Trevani et al., 2003).

Es bleibt jedoch fraglich, ob die beschriebene Leukopenie sich funktionell auf die Effektivität des Organismus bei der Abwehr von Infektionen auswirkt.

1998 untersuchten Zimmermann et al. den Effekt von CpG-DNA im Zusammenhang mit einer Infektion von Mäusen mit Leishmanien in einer lethalen Dosis. Hierbei konnte sowohl ein protektiver als auch ein kurativer Effekt der CpG-DNA nachgewiesen werden (Zimmermann et al., 1998). Bei einer weiteren parasitären Erkrankung der Schistosomiasis konnte ein protektiver Effekt beobachtet werden (Chiaramonte et al., 2000).

In Bezug auf Bakterien konnte eine Protektion gegen Listeriose sowie gegen Tularämie nachgewiesen werden (Krieg et al., 1998; Klinman et al., 1999). Bei Viren sind ebenfalls protektive Effekte bei einer Infektion mit Herpes simplex Virus 2 (HSV2) beschrieben worden (Pyles et al., 2002; Ashkar et al., 2003). Jedoch ist es denkbar, dass ein Immunsystem, das durch Applikation von CpG-DNA bevorzugt eine T_H1 -Typ Antwort generiert, anfälliger für Infektionen ist, die zur effektiven Bekämpfung des Krankheitserregers eine starke T_H2 -Antwort benötigen.

Somit korreliert eine CpG induzierte Leukopenie in bestimmten Fällen keineswegs mit einer verminderten Potenz bei der Bewältigung von Infektionen.

5.2 CpG-DNA führt zu Vergrößerung von Lymphknoten und Milz

5.2.1 Wirkungen auf die Lymphknoten

Wie gezeigt bewirkt die Injektion von CpG-DNA eine Vergrößerung der Lymphknoten. Dieses Phänomen ist sowohl bei nicht drainierenden Lymphknoten nach einer peritonealen Injektion als auch bei drainierenden Lymphknoten nach einer lokalen Gabe in den Fuß zu beobachten. In den ersten beiden Tagen nach Injektion ähneln sich die Kinetiken beider Injektionsschemata. In beiden Fällen kommt es innerhalb von 2 Tagen zu einer Verdoppelung der Zellzahlen. Danach jedoch unterscheiden sie sich erheblich.

Bei einer systemischen Gabe des ODNs kommt es nach 3 Tagen wieder zu einer Normalisierung des Zellgehalts der Lymphknoten. Während dieser Zeit war die Leukozytenzellzahl im Blut stark abgefallen. Der Abfall im Blut könnte einerseits durch ein Absterben der Zellen verursacht sein. Möglich ist aber auch, dass die Leukozyten nach dem Stimulus durch die ODN-Gabe in lymphoide Organe abwandern, da CpG-DNA dem Organismus eine mögliche Gefahr signalisiert (Heeg et al., 1998). Gleichzeitig ist bekannt, dass es zur Ausschüttung verschiedener Zytokine, z. B. von Interferon, kommt (Lipford et al., 1997). Interferon führt bekanntermaßen zu einer Vergrößerung der Lymphknoten mit einer Verdoppelung der Zellzahl innerhalb von 24 Stunden. Dabei wird angenommen, dass es im Rahmen der Rezirkulation von Lymphozyten zwischen Blut und Lymphknoten zu einer Behinderung des Abflusses aus den Lymphknoten in das Blut kommt (Gresser et al., 1981).

Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass es im Rahmen eines verstärkten Proliferationsereignisses zu einer Vermehrung der Zellen in den Lymphknoten gekommen sein könnte. Lipford et al. beschrieben bereits die gezeigte Kinetik für die lokale Gabe in den Fuß, bei der es nach drei Tagen im Gegensatz zu der oben erwähnten systemischen Gabe nicht zu einer Normalisierung der Zellzahl im lokal drainierenden Lymphknoten kommt, sondern zu einer 47-fachen Vergrößerung des Lymphknotens an Tag 10. Obwohl eine Proliferation von B-Zellen hierzu beiträgt, konnten sie zeigen, dass der Hauptgrund für die starke Vergrößerung des lokalen Lymphknotens am Tag 10 in einer Einwanderung von Zellen

aus anderen Kompartimenten, v. a. der Milz, besteht, da splenektomierte Mäuse nicht mit einer derartigen Vergrößerung des Lymphknoten an Tag 10 reagierten (Lipford et al., 2000).

5.2.2 Wirkungen auf die Milz

Wie gezeigt wurde kommt es nach CpG-Gabe zu einer Splenomegalie, die sich in einer Verdreifachung von Milzgewicht und Zellzahl an Tag 7 widerspiegelt. Schon am ersten Tag nach der Injektion steigen beide Parameter stark an. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass alle untersuchten Zellpopulationen eine Erhöhung der Zellzahl erfahren. Bemerkenswert war ebenfalls, dass nur während der ersten vier Tage eine relative Veränderung der Zellpopulationen in der Milz zu beobachten war. Am Tag sieben, an dem der Zellgehalt seinen Höhepunkt erreicht hat, sind die relativen Anteile der Zellpopulationen wieder auf Ausgangsniveau. Diese Ergebnisse wurden bereits teilweise von Sparwasser et al. erhoben (Sparwasser et al., 1999). Jedoch wurden damals nicht alle Experimente mit einem Kontroll-ODN durchgeführt. Ebenfalls wurde nur die Tage 4, 6 und 8 untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden einige Versuche ergänzt bzw. erweitert. Möglicherweise sind für die beschriebene Entwicklung mehrere Vorgänge von Bedeutung. Der Anstieg der Zellzahl bereits am ersten Tag nach der CpG-Gabe könnte durch Umverteilung von Zellen aus anderen Kompartimenten verursacht sein, da er mit der Leukopenie im Blut zeitlich korreliert. Für das Verständnis der starken Zellzunahme an Tag 7 jedoch wird noch eine weitere Erklärung notwendig. Zum Teil kommt es zu diesem Zeitpunkt zu einer extramedullären Hämatopoese in der Milz mit Zunahme von Granulozyten-Makrophagen Vorläuferzellen und sowie einer Zunahme der Erythrozytenvorläufer (Sparwasser et al., 1999), was die relative Zunahme der CD3⁺/B220⁻-Zellen erklärt. Die stärkste Erhöhung wird aber bei den T- und B-Zellen beobachtet. Ob es sich dabei um eine Umverteilung aus anderen Kompartimenten oder um eine Vervielfältigung der Zellzahl durch Proliferation handelt wurde in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt. Die starke Zunahme von Milzgewicht und Zellzahl in der Milz gleicht in ihrer Kinetik dem Effekt von CpG-DNA auf einen lokal drainierenden Lymphknoten. Das Oligo wird bei einer intraperitonealen Injektion direkt vor die Milz gebracht. Es könnte sich somit um einen lokalen Effekt handeln. Dies kann jedoch ausgeschlossen werden, da eine vergleichbare Zunahme von Milzgewicht und Zellzahl in der Milz ebenfalls bei einer Injektion von 5 mmol 1668 in den Fuß zu verzeichnen war (Daten nicht gezeigt).

5.3 Einfluss von Chemokinen auf die Verteilung von Leukozyten

Die Chemokine SDF und ELC haben keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellen in den ersten Stunden nach Gabe von ODN. Mitarbeiter im Labor konnten zeigen, dass das Chemokin ELC 24 Stunden nach CpG-Gabe erhöht ist. Eine Erhöhung der Expression der Chemokine SDF und ELC in den Lymphknoten und der Milz nach zwei Stunden konnte nicht nachgewiesen werden. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Verabreichung von CpG-DNA zu einer Ausschüttung präformierter Chemokine führt, die Wanderungsbewegungen von Lymphozyten nach sich ziehen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass andere Chemokine, die ebenfalls Effekte auf Leukozyten aufweisen (Warnock et al., 2000), eine entscheidende Rolle bei der frühen Umverteilung der Zellen spielen (Kim und Broxmeyer, 1999).

5.4 CpG-DNA bewirkt eine transiente TNF α -abhängige Thrombozytopenie im Blut

Die Applikation von CpG-DNA führt zu einer transienten Thrombozytopenie. Hierbei handelt es sich um einen Effekt, der in seiner Kinetik mit dem der Leukozytenzellzahlen vergleichbar ist. Die Thrombozyten sinken bereits 3 Stunden nach Gabe des ODNs ab und erreichen ihren Tiefpunkt am zweiten Tag, um nach 5 Tagen wieder auf Ausgangswerte zurückzukehren.

Bei diesem Phänomen könnte es sich um einen direkten Effekt von CpG-DNA auf die Thrombozyten handeln. Jedoch konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden, dass Blutplättchen einen CpG-DNA-Rezeptor besitzen, und somit kann eine direkte Interaktion nicht für die beschriebene Thrombozytopenie verantwortlich gemacht werden.

Vielmehr ist dieser Effekt TNF α vermittelt. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei TNFR(p55)^{-/-}-Mäusen lediglich zu einem leichten Abfall der Thrombozytenzahlen gegenüber dem Ausgangswert kam. Es ist bekannt, dass die Applikation CpG-DNA zu einer Ausschüttung von TNF α führt (Lipford et al., 1997; Sparwasser et al., 1997b). TNF α besitzt die Fähigkeit, das Endothel von Blutgefäßen so zu verändern, dass es eine intravaskuläre

prokoagulatorische Wirkung entfalten und somit zu vermehrtem Thrombozytenverbrauch im Sinne einer disseminierten intravasalen Gerinnung führen kann (Nawroth and Stern, 1986; Levi et al., 1993). Möglicherweise ist dieser Mechanismus bei pathologischen Prozessen, wie einer Sepsis, die durch TNF α vermittelt werden, von besonderer Bedeutung (Vassalli, 1992).

Fraglich bleibt allerdings, ob die gezeigte Thrombozytopenie sich negativ auf die zelluläre Blutgerinnung auswirkt.

5.5 Veränderungen im Blut sind unabhängig vom Applikationsweg der CpG-DNA

Wie oben bereits erwähnt führt eine intraperitoneale Injektion von 10 nmol 1668 zu einer rasch beginnenden transienten Leuko- und Thrombozytopenie. Die gleichen Effekte konnten mit einer Injektion von 5 nmol 1668 in den rechten Fußballen erzielt werden. Ein Mitarbeiter im Labor testete die intravenöse Injektion von 10 nmol 1668 und konnte gleiche Ergebnisse erzielen. Dies spricht dafür, dass diese Substanz durch eine hohe Bioverfügbarkeit charakterisiert ist. Gleichzeitig besagt es aber auch, dass die Durchblutung in den Kompartimenten, in die injiziert wurde, sehr gut ist und somit eine schnelle Resorption gewährleistet ist.

Da bei diesen drei Injektionsschemata nicht jeweils die gleiche Menge 1668 in den Organismus gegeben wurde, sind die Ergebnisse nicht gänzlich vergleichbar.

5.6 Die Wirkungen der CpG-DNA sind sequenzspezifisch

Bei den untersuchten Merkmalen konnte bei fast allen Effekten eine Sequenzspezifität festgestellt werden. Das inverse GpC-Motiv zeigt keine Auswirkungen auf die Blutzellen. Dies bestätigt das von Krieg beschriebene System der CpG-Abhängigkeit (Krieg et al., 1995). Jedoch ist ein gewisser Effekt des Kontroll-ODNs bei einer lokalen Injektion der DNA in den Fußballen zu erkennen. Hierbei kommt es zu einem schnelleren Anstieg der Zellzahl im drainierenden Lymphknoten. Die maximale Zellzahl wird weit früher erreicht (5-facher

Zellzahlanstieg an Tag 2) als bei dem CpG-ODN und erreicht bei weitem nicht die Werte einer Injektion mit dem ODN 1668 (47-facher Zellzahlanstieg an Tag 10).

Dieses Phänomen kann viele Ursachen haben. Es könnte sich dabei um unspezifische Wirkungen der Phosphothioatbrücken handeln, für die eine starke negative Ladung angenommen wird (Stein and Cheng, 1993). Weiterhin könnte in diesem Zusammenhang ein TLR9-unabhängiger Mechanismus eine Rolle spielen.

5.7 Mögliche pathologische Effekte der CpG-DNA

Es bleibt weiterhin unklar, ob alleinige Anwendung von CpG-DNA zu pathologischen Prozessen im Organismus führen kann. Besondere Bedenken bestehen hierbei in der Induktion von organspezifischen und systemischen Autoimmunerkrankungen sowie dem Auslösen eines toxischen Schock Syndroms, worauf die beschriebenen Symptome wie Leukopenie, Thrombopenie in Kombination mit Lymphadenopathie und Splenomegalie einen Hinweis geben können.

Es ist bekannt, dass Lipopolysaccharid einen toxischen Schock durch eine Überproduktion von TNF α verursachen kann. Die gleichzeitige Verabreichung von CpG-DNA mit geringen Dosen von LPS verursacht eine hohe Morbidität und Mortalität (Cowdery et al., 1996; Sparwasser et al., 1997a). Weiterhin wurden bei täglicher Verabreichung von CpG-DNA an Mäuse über einen Zeitraum von drei Wochen eine Zerstörung der Follikelarchitektur in Lymphknoten, multifokale Lebernekrosen und hämorrhagischer Aszites beobachtet (Heikenwalder et al., 2004).

Jedoch verursacht die wöchentliche Gabe von CpG-DNA in Dosen, die typischerweise zu Adjuvansexperimenten verabreicht werden, an BALB/c-Mäusen über einen Zeitraum von vier Monaten weder eine Veränderung des Gesamtzustandes der Tiere noch eine nachweisbare Schädigung deren Organe (Klinman et al., 1997).

In mehreren Untersuchungen, viele davon Phase-I-Studien, wurden zudem die Wirkungen auf den Menschen untersucht. Es konnten bisher keine Hinweise nachgewiesen werden, die zu negativen Effekten im menschlichen Organismus führen (Wang et al., 1998; Liu, 2003). Hierbei könnte die unterschiedliche Expression des TLR9-Rezeptors im Menschen und in der Maus eine große Rolle spielen. Auf humanen Zellen ist der TLR9-Rezeptor lediglich auf

plasmazytoiden dendritischen Zellen und B-Zellen zu finden. In der Maus exprimieren zusätzlich Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen diesen Rezeptor (Takeshita et al., 2001; Bauer et al., 2001; Hornung et al., 2002).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkungen von CpG-DNA auf die Verteilung von Thrombozyten und Leukozyten im Blut und in den lymphatischen Organen sowie mögliche Mechanismen, die dabei eine Rolle spielen.

CpG-DNA führt bereits nach 3 Stunden zu einer transienten Leukopenie im Blut, die v. a. die Lymphozyten betrifft und etwas verzögert auch zu einer Granulozytopenie führt. In dieser Phase kommt es zu markanten Veränderungen im Differentialblutbild mit einem starken prozentualen Anstieg der Granulozyten. Nach 4 bis 5 Tagen erreichten die untersuchten Parameter wieder die Ausgangswerte.

Gleichzeitig mit dem Zellabfall im Blut kommt es zu einer deutlichen Vergrößerung von Milz und Lymphknoten durch eine Erhöhung der Zellzahl in diesen Organen. Dies lässt vermuten, dass Umverteilungsprozesse von Zellen aus dem Blut in lymphatische Organ hierbei eine wichtige Rolle spielen.

Eine Beteiligung neu synthetisierter Chemokine ELC und SDF nach Gabe der CpG-DNA bei der frühen Phase der Umverteilung der Zellen konnte nicht nachgewiesen werden.

Thrombozyten fallen nach CpG-DNA-Gabe ebenfalls stark ab. Bei TNFR(p55)^{-/-}-Mäusen ist dieser Effekt jedoch nicht zu beobachten. Damit konnte gezeigt werden, dass TNF α in der Vermittlung der Thrombozytopenie eine wichtige Rolle spielt.

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.

Ashkar,A.A., Bauer,S., Mitchell,W.J., Vieira,J., and Rosenthal,K.L. (2003). Local delivery of CpG oligodeoxynucleotides induces rapid changes in the genital mucosa and inhibits replication, but not entry, of herpes simplex virus type 2. *J. Virol.* 77, 8948-8956.

Athens,J.W., Haab,O.P., Raab,S.O., Mauer,A.M., Ashenbrucker,H., Cartwright,G.E., and Wintrobe,M.M. (1961). Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J. Clin. Invest* 40, 989-995.

Baggiolini,M., Moser,B., and Clark-Lewis,I. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. The Giles Filley Lecture. *Chest* 105, 95S-98S.

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

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

Broxmeyer,H.E., Kim,C.H., Cooper,S.H., Hangoc,G., Hromas,R., and Pelus,L.M. (1999). Effects of CC, CXC, C, and CX3C chemokines on proliferation of myeloid progenitor cells, and insights into SDF-1-induced chemotaxis of progenitors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 872, 142-162.

Chiaromonte,M.G., Hesse,M., Cheever,A.W., and Wynn,T.A. (2000). CpG oligonucleotides can prophylactically immunize against Th2-mediated schistosome egg-induced pathology by an IL-12-independent mechanism. *J. Immunol.* 164, 973-985.

Cowdery,J.S., Chace,J.H., Yi,A.K., and Krieg,A.M. (1996). Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J. Immunol.* *156*, 4570-4575.

Demetri,G.D. and Griffin,J.D. (1991). Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* *78*, 2791-2808.

Gomis,S., Babiuk,L., Allan,B., Willson,P., Waters,E., Ambrose,N., Hecker,R., and Potter,A. (2004). Protection of neonatal chicks against a lethal challenge of *Escherichia coli* using DNA containing cytosine-phosphodiester-guanine motifs. *Avian Dis.* *48*, 813-822.

Gresser,I., Guy-Grand,D., Maury,C., and Maunoury,M.T. (1981). Interferon induces peripheral lymphadenopathy in mice. *J. Immunol.* *127*, 1569-1575.

Gunn,M.D., Tangemann,K., Tam,C., Cyster,J.G., Rosen,S.D., and Williams,L.T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 258-263.

Hacker,H., Vabulas,R.M., Takeuchi,O., Hoshino,K., Akira,S., and Wagner,H. (2000). Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J. Exp. Med.* *192*, 595-600.

Hayashi,F., Means,T.K., and Luster,A.D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* *102*, 2660-2669.

Heeg,K., Sparwasser,T., Lipford,G.B., Hacker,H., Zimmermann,S., and Wagner,H. (1998). Bacterial DNA as an evolutionary conserved ligand signalling danger of infection to immune cells. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *17*, 464-469.

Heikenwalder,M., Polymenidou,M., Junt,T., Sigurdson,C., Wagner,H., Akira,S., Zinkernagel,R., and Aguzzi,A. (2004). Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat. Med.* *10*, 187-192.

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

- 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., Rotem,Z., and Fantes,K.H. (1966). An inhibitor of the production of interferon ("blocker"). *Virology* 29, 248-254.
- Ito,S., Ishii,K.J., Shirota,H., and Klinman,D.M. (2004). CpG oligodeoxynucleotides improve the survival of pregnant and fetal mice following *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* 72, 3543-3548.
- Janeway,C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1, 1-13.
- Janeway,C.A., Jr. and Medzhitov,R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197-216.
- Jensen,K.E., Neal,A.L., Owens,R.E., and Warren,J. (1963). Interferon responses of chick embryo fibroblasts to nucleic acids and related compounds. *Nature* 200, 433-434.
- Junqueira & Carneiro (1995). Blutbildung. In *Histologie*, Schiebler, ed., pp. 326-341.
- Kanellos,T.S., Sylvester,I.D., Butler,V.L., Ambali,A.G., Partidos,C.D., Hamblin,A.S., and Russell,P.H. (1999). Mammalian granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and some CpG motifs have an effect on the immunogenicity of DNA and subunit vaccines in fish. *Immunology* 96, 507-510.
- Kawasaki,H., Moriyama,M., Hirao,C., Takahashi,T., Naruse,N., Kobayashi,S., and Tanaka,A. (1986). Effects of interferon on the lymphocyte subset in the blood and lymphoid organs in mice. *J. Interferon Res.* 6, 507-517.
- Kim,C.H. und Broxmeyer,H.E. (1999). Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J. Leukoc. Biol.* 65, 6-15.

Klinman,D.M., Conover,J., and Coban,C. (1999). Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection. *Infect. Immun.* *67*, 5658-5663.

Klinman,D.M., Takeno,M., Ichino,M., Gu,M., Yamshchikov,G., Mor,G., and Conover,J. (1997). DNA vaccines: safety and efficacy issues. *Springer Semin. Immunopathol.* *19*, 245-256.

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

Krieg,A.M., Love-Homan,L., Yi,A.K., and Harty,J.T. (1998). CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J. Immunol.* *161*, 2428-2434.

Krieg,A.M., Yi,A.K., Matson,S., Waldschmidt,T.J., Bishop,G.A., Teasdale,R., Koretzky,G.A., and Klinman,D.M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* *374*, 546-549.

Krug,A., Rothenfusser,S., Selinger,S., Bock,C., Kerkmann,M., Battiany,J., Sarris,A., Giese,T., Speiser,D., Endres,S., and Hartmann,G. (2003). CpG-A oligonucleotides induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells. *J. Immunol.* *170*, 3468-3477.

Levi,M., ten Cate,H., van der,P.T., and van Deventer,S.J. (1993). Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA* *270*, 975-979.

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

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

Liu,M.A. (2003). DNA vaccines: a review. *J. Intern. Med.* *253*, 402-410.

- Messina,J.P., Gilkeson,G.S., and Pisetsky,D.S. (1991). Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J. Immunol.* *147*, 1759-1764.
- Nawroth,P.P. and Stern,D.M. (1986). Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* *163*, 740-745.
- Olbrich,A.R., Schimmer,S., and Dittmer,U. (2003). Preinfection treatment of resistant mice with CpG oligodeoxynucleotides renders them susceptible to friend retrovirus-induced leukemia. *J. Virol.* *77*, 10658-10662.
- Picker,L.J. and Butcher,E.C. (1992). Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu. Rev. Immunol.* *10*, 561-591.
- Pugin,J., Heumann,I.D., Tomasz,A., Kravchenko,V.V., Akamatsu,Y., Nishijima,M., Glauser,M.P., Tobias,P.S., and Ulevitch,R.J. (1994). CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity.* *1*, 509-516.
- Pyles,R.B., Higgins,D., Chalk,C., Zalar,A., Eiden,J., Brown,C., Van Nest,G., and Stanberry,L.R. (2002). Use of immunostimulatory sequence-containing oligonucleotides as topical therapy for genital herpes simplex virus type 2 infection. *J. Virol.* *76*, 11387-11396.
- Razin,A. and Friedman,J. (1981). DNA methylation and its possible biological roles. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *25*, 33-52.
- Rennick,D., Yang,G., Gemmell,L., and Lee,F. (1987). Control of hemopoiesis by a bone marrow stromal cell clone: lipopolysaccharide- and interleukin-1-inducible production of colony-stimulating factors. *Blood* *69*, 682-691.
- Rollins,B.J. (1997). Chemokines. *Blood* *90*, 909-928.
- Rotem,Z., Cox,R.A., and Isaacs,A. (1963). Inhibition of virus multiplication by foreign nucleic acid. *Nature* *197*, 564-566.
- Senaldi,G. and Piguet,P.F. (1998). Mortality and platelet depletion occur independently of fibrinogen consumption in murine models of tumour necrosis factor-mediated systemic inflammatory responses. *Cytokine* *10*, 382-389.

- Smeaton,T.C. (1984). Migration of polymorphonuclear neutrophils and macrophages from bone marrow to the peritoneal cavity after (3H)-thymidine labelling of rat tibial bone marrow in vivo. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 62 (Pt 4), 453-463.
- Sparwasser,T., Hultner,L., Koch,E.S., Luz,A., Lipford,G.B., and Wagner,H. (1999). Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis. *J. Immunol.* 162, 2368-2374.
- Sparwasser,T., Miethke,T., Lipford,G., Borschert,K., Hacker,H., Heeg,K., and Wagner,H. (1997a). Bacterial DNA causes septic shock. *Nature* 386, 336-337.
- Sparwasser,T., Miethke,T., Lipford,G., Erdmann,A., Hacker,H., Heeg,K., and Wagner,H. (1997b). Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *Eur. J. Immunol.* 27, 1671-1679.
- Sparwasser,T., Vabulas,R.M., Villmow,B., Lipford,G.B., and Wagner,H. (2000). Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur. J. Immunol.* 30, 3591-3597.
- Stein,C.A. and Cheng,Y.C. (1993). Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical? *Science* 261, 1004-1012.
- Stein,C.A., Subasinghe,C., Shinozuka,K., and Cohen,J.S. (1988). Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 16, 3209-3221.
- Tacchini-Cottier,F., Vesin,C., Redard,M., Buurman,W., and Piguet,P.F. (1998). Role of TNFR1 and TNFR2 in TNF-induced platelet consumption in mice. *J. Immunol.* 160, 6182-6186.
- Takeshita,F., Leifer,C.A., Gursel,I., Ishii,K.J., Takeshita,S., Gursel,M., and Klinman,D.M. (2001). Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J. Immunol.* 167 , 3555-3558.
- Tokunaga,T., Yamamoto,H., Shimada,S., Abe,H., Fukuda,T., Fujisawa,Y., Furutani,Y., Yano,O., Kataoka,T., Sudo,T., and . (1984). Antitumor activity of deoxyribonucleic acid

fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 72, 955-962.

Tokunaga,T., Yano,O., Kuramoto,E., Kimura,Y., Yamamoto,T., Kataoka,T., and Yamamoto,S. (1992). Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. *Microbiol. Immunol.* 36, 55-66.

Tousignant,J.D., Gates,A.L., Ingram,L.A., Johnson,C.L., Nietupski,J.B., Cheng,S.H., Eastman,S.J., and Scheule,R.K. (2000). Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice. *Hum. Gene Ther.* 11, 2493-2513.

Trevani,A.S., Chorny,A., Salamone,G., Vermeulen,M., Gamberale,R., Schettini,J., Raiden,S., and Geffner,J. (2003). Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. *Eur. J. Immunol.* 33, 3164-3174.

Vassalli,P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 411-452.

Wang,R., Doolan,D.L., Le,T.P., Hedstrom,R.C., Coonan,K.M., Charoenvit,Y., Jones,T.R., Hobart,P., Margalith,M., Ng,J., Weiss,W.R., Sedegah,M., de Taisne,C., Norman,J.A., and Hoffman,S.L. (1998). Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 282, 476-480.

Warnock,R.A., Campbell,J.J., Dorf,M.E., Matsuzawa,A., McEvoy,L.M., and Butcher,E.C. (2000). The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J. Exp. Med.* 191, 77-88.

Watson,J.D. und Crick,F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. J.D. Watson and F.H.C. Crick. Published in *Nature*, number 4356 April 25, 1953. *Nature* 248 , 765.

Wesche,H., Henzel,W.J., Shillinglaw,W., Li,S., and Cao,Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* 7, 837-847.

Wild,J., Grusby,M.J., Schirmbeck,R., and Reimann,J. (1999). Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent. *J. Immunol.* *163*, 1880-1887.

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

Yi,A.K., Hornbeck,P., Lafrenz,D.E., and Krieg,A.M. (1996). CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM-induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of c-myc and bcl-xL. *J. Immunol.* *157*, 4918-4925.

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

Danksagung

Für die Unterstützung dieser Arbeit möchte ich mich bedanken bei:

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

Meinen Arbeitsgruppenleitern Dr. Grayson B. Lipford und PD Dr. Stefan Bauer für ihre kompetente Betreuung und zahlreiche überaus hilfreiche Diskussionen

Norbert Heinrich für die wertvolle Zusammenarbeit und seine Fähigkeit mich unbewusst immer wieder neu zu motivieren

Franziska Ampenberger, Tanja Gellert, Susanne Hausmann, Monika Maier, Peter Hochholzer, Marc Bauer, Florian Heil und Mark Rutz für unzählige, wertvolle Hilfen im Laboralltag sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre

Meinen Freunden außerhalb des Labors für ihr Verständnis für meine häufige Abwesenheit

Claudia, Martin, Mark, Natalie und John

Meinen Eltern