

**Immunstimulatorische Aktivität von  
CpG-Oligonukleotiden  
im Menschen und im Rhesusaffen**

Aktivierung humaner Natürlicher Killer T-Zellen  
durch CpG-Oligonukleotide und  $\alpha$ -Galaktosylceramid  
und  
Etablierung eines nicht-humanen Primatenmodells  
für präklinische Studien mit CpG-Oligonukleotiden

vorgelegt von  
Anja Marschner  
aus Usingen  
2004

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

**Immunstimulatorische Aktivität von  
CpG-Oligonukleotiden  
im Menschen und im Rhesusaffen**

Aktivierung humaner Natürlicher Killer T-Zellen  
durch CpG-Oligonukleotide und  $\alpha$ -Galaktosylceramid  
und  
Etablierung eines nicht-humanen Primatenmodells  
für präklinische Studien mit CpG-Oligonukleotiden

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Anja Marschner  
aus Usingen  
2004

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. med. J. M. Schmoeckel  
Prof. Dr. med. J. Johnson

Betreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Priv. Doz. Dr. med. G. Hartmann  
Dr. med. S. Rothenfußer

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung:

09.11.2004

Meinen Eltern gewidmet

**INHALTSVERZEICHNIS**

**1 EINLEITUNG** ..... 3

1.1 Fragestellung und Ziel der Arbeit ..... 3

1.2 Vakzine und Adjuvantien - heutiger Stand ..... 5

1.3 Angeborene und erworbene Immunität ..... 6

1.4 *Pattern Recognition Rezeptoren* als Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität ..... 7

1.5 Dendritische Zellen ..... 9

    1.5.1 *Funktion dendritischer Zellen innerhalb des Immunsystems* ..... 9

    1.5.2 *Myeloide dendritische Zellen: Klassische DC* ..... 10

    1.5.3 *Plasmazytoide dendritische Zellen: Zwischen Interferon-produzierenden Zellen und DC* ..... 11

1.6 T-Lymphozyten ..... 11

1.7 Natürliche Killer T(NKT)-Zellen ..... 14

    1.7.2 *Entdeckung muriner V $\alpha$ 14+ NKT-Zellen* ..... 14

    1.7.3 *Humane V $\alpha$ 24+ NKT-Zellen* ..... 15

    1.7.4 *Physiologische Funktion von NKT-Zellen* ..... 16

    1.7.5 *Entwicklung von NKT-Zellen* ..... 18

    1.7.6 *Das CD1d-restringierte, NKT-Zell-spezifische Antigen  $\alpha$ -Galaktosylceramid* ..... 19

1.8 CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN) ..... 22

    1.8.1 *Entdeckung der immunstimulatorischen Aktivität von bakterieller DNA* ..... 22

    1.8.2 *Stimulation des Immunsystems durch CpG-DNA* ..... 23

    1.8.3 *Einteilung synthetischer CpG-Oligonukleotide in CpG-A, -B und -C* ..... 24

    1.8.4 *Immuntherapeutische Anwendung von CpG-ODN* ..... 27

    1.8.5 *Spezies-spezifische Unterschiede in der Erkennung von CpG-ODN* ..... 29

1.9 *Das Simian Immunodeficiency Virus (SIV) im Rhesusaffen als Infektionsmodell für das Human Immunodeficiency Virus (HIV)* ..... 30

**2 MATERIAL UND METHODEN** ..... 32

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien ..... 32

2.2 Präparation, Isolation und Kultur von Zellen ..... 35

2.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) ..... 38

2.4 Zytokinbestimmung mit ELISA ..... 40

2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ..... 41

2.6 Engerix B-Vakzinierung ..... 43

2.7 Experimente mit CpG-ODN in Vollblut, Plasma und Serum ..... 44

2.8 SIV-Assay zur Untersuchung der antiviralen Aktivität von CpG-ODN ..... 44

2.9 Statistische Analysen ..... 46

**3 ERGEBNISSE** ..... 47

**Teil I: Aktivierung humaner NKT-Zellen durch CpG-ODN und  $\alpha$ -GalCer** ..... 47

3.1 Detektion und Anreicherung humaner NKT-Zellen ..... 47

3.2	TLR-Expression in humanen NKT-Zellen.....	48
3.3	Stimulation humaner NKT-Zellen mit CpG-ODN und $\alpha$ -GalCer.....	49
3.4	Mechanismen der Aktivierung humaner NKT-Zellen durch $\alpha$ -GalCer und CpG-ODN .	53
3.4.1	<i>CD1d-Expression auf Antigen-präsentierenden Zellen und Beteiligung der myeloiden DC an der <math>\alpha</math>-GalCer-spezifischen NKT-Zell-Aktivierung</i> .....	53
3.4.2	<i>Beteiligung der plasmazytoiden DC an der CpG-vermittelten Aktivierung von NKT-Zellen via IFN-<math>\alpha</math></i> .....	54
3.4.3	<i>Steigerung der Antigen-spezifischen IFN-<math>\gamma</math>-Produktion in NKT-Zellen durch direkten Zell-zu-Zell-Kontakt zwischen NKT-Zellen und PDC</i> .....	57
<b>Teil II: Etablierung eines nicht-humanen Primatenmodells für präklinische Studien mit CpG-ODN</b> .....		60
3.5	Detektion von Rhesus-Immunzellen aus dem peripheren Blut von Rhesusaffen .....	60
3.6	Immunstimulatorische Aktivität von CpG-A und -B im nicht-humanen Primaten .....	61
3.6.1	<i>CpG-A: IFN-<math>\alpha</math>-Induktion und Aktivierung von Monozyten</i> .....	61
3.6.2	<i>CpG-B: Präferentielle Aktivierung von Rhesus-B-Zellen</i> .....	62
3.7	<i>In vivo</i> -Untersuchung der Adjuvans-Eigenschaften von CpG-A und CpG-B bei einer Hepatitis B-Vakzinierung im Rhesusaffen.....	64
3.8	Hemmung der Wirkung von CpG-ODN durch humane Blutbestandteile .....	66
3.9	Untersuchung der antiviralen Aktivität von CpG-induzierten löslichen Faktoren gegenüber <i>Simian Immunodeficiency Virus (SIV)</i> .....	70
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	73
4.1	Übersicht über die experimentellen Befunde .....	73
4.2	Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur .....	76
4.2.1	<i>Aktivierung von NKT-Zellen durch CpG-aktivierte PDC</i> .....	76
4.2.2	<i>Mechanismen der CpG-induzierten NKT-Zell-Aktivierung</i> .....	83
4.2.3	<i>Anwendung humaner CpG-ODN in einem nicht-humanen Primatenmodell</i> .....	91
4.2.4	<i>Die Rolle der PDC in der antiviralen Immunabwehr und CpG-basierte Therapieansätze gegen SIV bzw. HIV</i> .....	96
4.3	Zukunft einer CpG- und $\alpha$ -GalCer-basierten Vakzine .....	100
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	103
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b> .....	106
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....		120
<b>DANKSAGUNG</b> .....		122
<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b> .....		123
<b>LEBENS LAUF</b> .....		125

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ein Impfschutz gegen intrazelluläre Erreger und Tumore setzt eine anhaltende zelluläre Immunität vermittelt durch CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen voraus. Die Entwicklung solcher T-Zell-Vakzine bereitet bis heute große Schwierigkeiten. Sowohl CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN) als auch  $\alpha$ -Galaktosylceramid ( $\alpha$ -GalCer) verstärkten als Adjuvantien *in vivo* die spezifische zelluläre Immunität. Die Kombination von CpG-ODN und  $\alpha$ -GalCer könnte möglicherweise die Entwicklung einer T-Zell-vermittelten Immunität synergistisch verstärken. Um sich dieser Fragestellung zu nähern, sollte zunächst untersucht werden, ob die  $\alpha$ -GalCer-spezifische Aktivierung humaner NKT-Zellen durch Kostimulation mit CpG-ODN gesteigert wird.

Zahlreiche Studien berichten, dass CpG-ODN die Entwicklung einer spezifischen T-Zellantwort *in vivo* verstärken (Davis, 1998; Heckelsmiller, 2002b; Verthelyi, 2002). Bisher sind jedoch die zugrunde liegenden Mechanismen, über die CpG-DNA eine spezifische zelluläre Immunantwort aktiviert, noch wenig erforscht. Hauptsächlich werden die beobachteten CpG-vermittelten Effekte auf T-Zellen auf lösliche Faktoren, wie Zytokine (Typ-I-IFN) und Chemokine, zurückgeführt, die nach CpG-Stimulation von plasmazytoiden Zellen (PDC) freigesetzt werden (Rothenfusser, 2001). Am Beispiel der Interaktion zwischen humanen PDC und einer speziellen Memory-T-Zellpopulation, den Natürlichen Killer T(NKT)-Zellen, sollten in dieser Arbeit grundsätzliche Erkenntnisse über die Interaktion zwischen CpG-aktivierten PDC mit T-Zellen gewonnen werden, die möglicherweise weitere Aufschlüsse über die Funktion der PDC innerhalb des menschlichen Immunsystems geben können. *Teil I* dieser Arbeit befasst sich daher mit folgenden Fragen:

- 1) Werden NKT-Zellen innerhalb von humanen peripheren Blutlymphozyten (PBMC) durch CpG-ODN stimuliert und verstärken CpG-ODN synergistisch die Aktivierung von NKT-Zellen durch deren spezifisches Glykolipid-Antigen  $\alpha$ -GalCer?
- 2) Über welche Mechanismen verstärken CpG-ODN die Aktivierung der NKT-Zellen durch das Glykolipid-Antigen  $\alpha$ -GalCer?

Die meisten Erkenntnisse über die immunmodulatorischen Effekte von CpG-DNA stammen aus murinen Modellen. Die Spezies-spezifischen Unterschiede in der Erkennung von CpG-ODN in Maus und Mensch schränken die Übertragbarkeit dieser Daten auf das humane System stark ein.

Präklinische Untersuchungen bzgl. der Wirkung der distinkten CpG-Typen auf Primaten-Immunzellen sowie Dosisfindungs- und Toxizitätsstudien in nicht-humanen Primaten würden die Anwendung von CpG-ODN im Menschen effektiver und sicherer gestalten. Als Grundlage für CpG-Studien im Menschen ist die Etablierung eines nicht-humanen Primatenmodells deshalb essenziell. Der zweite Teil dieser Arbeit (*Teil II*) beschäftigt sich daher mit der Etablierung eines Primatenmodells im Rhesusaffen für präklinische Studien mit humanen CpG-ODN. Vorbereitend für die Entwicklung einer CpG-basierten Vakzine gegen das *Simian immunodeficiency virus* (SIV) und das *Human immunodeficiency virus* (HIV) sollte außerdem die Rolle der PDC bei einer SIV-Infektion näher untersucht werden. *Teil II* befasst sich somit mit folgenden Fragestellungen:

- 1) Weisen die beiden CpG-Typen, CpG-A und -B, im Rhesusaffen dieselbe immunstimulatorische Aktivität auf wie im humanen System?
- 2) Lassen sich plasmazytoide DC aus dem peripheren Blut von Rhesusaffen nachweisen und wenn ja, stimmen Frequenz und Eigenschaften von Rhesus-PDC mit denen humaner PDC überein?
- 3) Verstärken beide CpG-Typen gleichermaßen *in vivo* die Effektivität einer Hepatitis B-Vakzine und gibt es einen messbaren Serum-Parameter, über den man die systemische Immunstimulation durch CpG-ODN *in vivo* nachweisen kann?
- 4) Hemmen PDC durch Sekretion inflammatorischer Zytokine/Chemokine die Infektion von T-Zellen mit SIV?

*Teil II* liefert damit die Basis für die kombinierte Anwendung von CpG-ODN und  $\alpha$ -GalCer im Primaten und für die Entwicklung CpG-basierter T-Zell-Vakzine gegen intrazelluläre Erreger und Viren, wie z.B. HIV.



## 1.2 Vakzine und Adjuvantien - heutiger Stand

Die Entwicklung protektiver Vakzine gehört zu den größten Erfolgen der Medizin. Weltweite Impfkampagnen im 20. Jahrhundert konnten lebensbedrohliche Infektionskrankheiten, wie Poliomyelitis und Pocken, erfolgreich eindämmen. Voraussetzung für einen anhaltenden Impfschutz ist die Generierung einer immunologischen Gedächtnisantwort. Gegen viele noch heute schwer behandelbare, zum Teil unheilbare Infektionskrankheiten gibt es jedoch bisher keine effektiven Vakzine. Dazu gehören die Tuberkulose, Lepra, Infektionen mit Parasiten (z.B. Malaria, Leishmaniose), das Hepatitis C-Virus und das *Human immunodeficiency virus* (HIV). Auch die Entwicklung einer prophylaktischen oder therapeutischen Vakzine gegen Tumore (z.B. Melanom, Sarkom) ist trotz vielfacher Versuche noch nicht zufriedenstellend gelungen. Allen diesen Krankheiten ist gemeinsam, dass ein Impfschutz zusätzlich zu spezifischen Antikörpern eine anhaltende zelluläre Immunität vermittelt durch spezifische CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen (CTL) sowie CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen erfordert. Gerade die Entwicklung solcher "T-Zell-Vakzine", deren Ziel ein langfristiger Schutz gegen intrazelluläre Pathogene und Tumore ist, bereitet bis heute große Schwierigkeiten und bleibt daher eine hohe Herausforderung der Medizin.

Die Identifizierung und Entwicklung geeigneter Adjuvantien ist ein viel beforschter Ansatz zur Verbesserung von T-Zell-Vakzine. Unter Adjuvans (*adiuvare* = lat. unterstützen, helfen) versteht man dabei in der Medizin eine Substanz, die in Kombination mit einem Immunogen verabreicht die Immunität verstärkt. Jules Freund war einer der Ersten, der entdeckte, dass Mykobakterien-Extrakte („*complete Freund's adjuvant*“, CFA = abgetötete Mykobakterien in einer Wasser-in-Öl-Emulsion) eine Immunisierung gegen ein spezifisches Antigen beschleunigen und verstärken können (Freund, 1942). Bis vor kurzem wusste man erst sehr wenig über die Mechanismen, mit denen Adjuvantien eine T- oder B-Zell-Antwort unterstützen. In den letzten Jahren konnten die chemischen Strukturen vieler Adjuvantien sowie ihr zellulärer und molekularer Wirkmechanismus aufgeklärt werden. Bei vielen potenten Adjuvantien handelt es sich um hochkonservierte Strukturen, die Mikroorganismen zu Eigen sind, sogenannte "*Pathogen-associated molecular patterns*" (PAMP). PAMP binden als Liganden an spezifische Rezeptoren auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und aktivieren diese. Als die wichtigsten APC des Immunsystems nehmen dendritische Zellen (DC) eine Schlüsselfunktion beim Priming naiver T-Zellen ein. Mit dem langfristigen Ziel, eine effektive T-Zell-Vakzine gegen Tumore und virale Infektionen - wie z.B. HIV - zu entwickeln, untersucht diese Arbeit die Wirkungsmechanismen und den Synergismus der beiden, erst in jüngerer Zeit entdeckten Adjuvantien CpG-Oligonukleotide und  $\alpha$ -Galaktosylceramid.

### 1.3 Angeborene und erworbene Immunität

Innerhalb des Immunsystems von Vertebraten unterscheidet man ein humorales von einem zellulären Abwehrsystem und eine "unspezifische" (angeborene) Komponente von einer "antigen-spezifischen" (adaptiven). Zum humoralen System gehören Mediatoren wie Zytokine und das Komplementsystem sowie spezifische Antikörper, die von aktivierten B-Zellen nach Antigenkontakt und klonaler Expansion adaptiv produziert werden. Zum zellulären Teil des Immunsystems rechnet man die dem angeborenen Immunsystem zugehörigen Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Natürlichen Killer(NK)-Zellen sowie die Antigen-spezifischen T-Lymphozyten der adaptiven Immunität (Janeway 2001).

Das zelluläre unspezifische Immunsystem ist charakterisiert durch eine angeborene Spezifität für "Nicht-Selbst". Es kann ohne Induktionsphase als "erste Verteidigungslinie" eine beginnende Infektion sofort bekämpfen. Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems besitzen spezifische Antigenrezeptoren, die durch somatische Rekombination diversifiziert sind. Sie können erst nach einer Anlaufphase und klonaler Expansion aktiv werden, sind dafür dann umso spezifischer und effektiver und sorgen durch Gedächtniszellen für eine andauernde und spezifische Protektion gegen ein Antigen. Klassische Vertreter der adaptiven zellulären Immunität sind die  $\alpha/\beta$  T-Zellen.

Die Funktion der Natürlichen Killer T(NKT)-Zellen, mit denen sich der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt, ist bisher erst unzureichend bekannt. NKT-Zellen nehmen offenbar eine Zwischenstellung zwischen angeborener und adaptiver Immunität ein, da sie Eigenschaften beider Systeme kombinieren. Ähnlich wie NK-Zellen werden NKT-Zellen in der Initialphase einer Immunantwort aktiviert und unterhalten und modifizieren eine Abwehrreaktion durch Zytokinausschüttung und zytotoxische Aktivität. Diese Eigenschaften sind typisch für Immunzellen der angeborenen Immunität. Andererseits besitzen NKT-Zellen einen spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR), mit dem sie eine sehr eng begrenzte Gruppe von Glykolipid-Antigenen spezifisch erkennen. Aufgrund bestimmter Oberflächenmarker (s.  $CD45R0^+/CD62L^-$  (D'Andrea, 2000)) und ihrer Fähigkeit, bei Aktivierung sofort Effektorfunktionen übernehmen zu können, werden NKT-Zellen als eine spezielle Memory-T-Zell-Population angesehen.

## 1.4 *Pattern Recognition Rezeptoren* als Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität

Viele mikrobielle Stoffwechselprodukte und Genprodukte kommen ausschließlich in Mikroorganismen vor, nicht in Vertebraten. Konservierte mikrobielle Moleküle, auch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP = *Pathogen-associated molecular patterns*) genannt, werden vom angeborenen Immunsystem des Vertebraten als Gefahrensignal einer mikrobiellen Infektion erkannt. Als Konsequenz wird eine adaptive Immunantwort gegen den vorliegenden Pathogentyp initiiert. Die Rezeptoren, über die das angeborene Immunsystem des Vertebraten PAMP detektiert und die folglich eine adaptive Immunantwort kontrollieren, werden als "*Pattern Recognition Rezeptoren*" (PRR) bezeichnet. PRR werden insbesondere von Antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und B-Zellen, exprimiert. Zu den wichtigsten PRR des Vertebraten zählen die Toll-like Rezeptoren (TLR).

### *Entdeckung des Drosophila Toll*

Toll-Rezeptoren sind evolutionär hoch-konservierte Typ-I-Transmembran-Proteine (Hashimoto, 1988). Das erste Mitglied der Familie der Toll-Rezeptoren, Drosophila Toll, wurde in der Drosophila-Fliege entdeckt und kontrolliert die dorsoventrale Ausrichtung in der Embryonalentwicklung der Drosophila-Fliege (Belvin, 1996; Anderson, 2000). Der Toll-Pathweg spielt aber auch eine Rolle in der Immunabwehr der Fruchtfliege. Toll-mutierte Drosophila-Fliegen weisen einen Defekt in der antifungalen Abwehr auf und sind daher sehr anfällig für Pilzinfektionen (Lemaitre, 1996).

### *Humane Toll-like Rezeptoren (TLR)*

Auf der Suche nach Rezeptoren des humanen angeborenen Immunsystems identifizierte die Arbeitsgruppe um Charles Janeway ein strukturhomologes Protein des Drosophila Toll im humanen System, das später Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) benannt wurde (Medzhitov, 1997). TLR4 wird unter anderem in Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und erkennt Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellwand gram-negativer Bakterien. In den vergangenen Jahren wurden im Vertebraten weitere TLR und ihre Liganden identifiziert, so dass die Familie der transmembranären TLR bis dato zehn Mitglieder (TLR1-10) umfasst (Medzhitov, 2001). Neben LPS erkennen TLR Lipoproteine, Flagellin und Peptidoglykane von Bakterien, Zymosan von Hefepilzen, bakterielle CpG-DNA und Doppelstrang-RNA von Viren (vgl. Tab. 1) (Medzhitov, 2001; Takeda, 2001). Nicht von allen TLR-Mitgliedern kennt man bisher ihre genaue Funktion oder/und ihre Liganden. An Erkennungsmechanismen, Signalweiterleitung und Funktionen der

einzelnen TLR wird derzeit intensiv geforscht. Es ist anzunehmen, dass in den kommenden Jahren weitere Erkenntnisse über die Funktion der TLR gewonnen sowie neue TLR-Mitglieder und TLR-Liganden identifiziert werden.

**Tab. 1: Humane Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden (nach (Medzhitov, 2001)).**

TLR	PAMP	Pathogen	Referenz
TLR1 TLR1/TLR2 <sup>1</sup>	kooperiert mit TLR2	n.d.	(Ozinsky, 2000)
TLR2	Lipoproteine	Bakterien	(Takeuchi, 2000)
	Peptidoglykane	gram <sup>+</sup> Bakterien	(Takeuchi, 1999) (Schwandner, 1999)
	LAM <sup>2</sup>	Mykobakterien	(Underhill, 1999)
	Zymosan	Hefen	(Ozinsky, 2000)
	GPI <sup>3</sup>	Trypanosoma cruzi	(Campos, 2001)
TLR2/TLR6 <sup>1</sup>	MALP-2 <sup>4</sup>	Mykoplasmen	(Takeuchi, 2000)
TLR3	dsRNA <sup>5</sup>	Viren	(Alexopoulou, 2001)
TLR4	LPS <sup>6</sup>	gram <sup>-</sup> Bakterien	(Poltorak, 1998) (Hoshino, 1999)
	RSV F(Fusions-)Protein <sup>7</sup>	RSV <sup>7</sup>	(Kurt-Jones, 2000)
	HSP60 <sup>8</sup>	Wirt	(Ohashi, 2000)
TLR5	Flagellin	Bakterien	(Hayashi, 2001)
TLR6 TLR2/TLR6 <sup>1</sup>	kooperiert mit TLR2		(Takeuchi, 2000)
TLR7	Imidazoquinoline	n.d.	(Hemmi, 2002)
TLR8	n.d.	n.d.	
TLR9	CpG-DNA	Bakterien, Viren	(Hemmi, 2000)
TLR10	n.d.	n.d.	

n.d., *not determined* = engl. noch nicht bekannt.

<sup>1</sup>Einige TLR formen Heterodimere miteinander und kooperieren bei der Erkennung bestimmter mikrobieller Strukturen, s. TLR1/TLR2 und TLR2/TLR6.

<sup>2</sup>LAM, Lipoarabinomannan; <sup>3</sup>GPI, Glykosylphosphatidylinositol; <sup>4</sup>MALP-2, Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid 2kDa; <sup>5</sup>dsRNA, doppelsträngige RNA; <sup>6</sup>LPS, Lipopolysaccharide; <sup>7</sup>RSV, *Respiratory syncytial virus*; <sup>8</sup>HSP60, Hitzeschock-Protein 60.

## 1.5 Dendritische Zellen

Im Folgenden werden die Hauptfunktionen dendritischer Zellen (DC) sowie ihre Unterteilung in verschiedene Subtypen beschrieben.

### 1.5.1 Funktion dendritischer Zellen innerhalb des Immunsystems

*DC sind Bindeglieder zwischen unspezifischer und spezifischer Immunität*

Von den unter dem Begriff der Antigen-präsentierenden Zellen (APC) zusammengefassten Zelltypen (Monozyten, B-Zellen oder dendritische Zellen) stellen die dendritischen Zellen bei weitem die bedeutsamste Gruppe dar. Erstmals wurden DC von Ralph Steinman im Jahr 1973 beschrieben (Steinman, 1973). Im Mittelpunkt des immunologischen Interesses stehen DC, seit man weiß, dass sie als einzige naive T-Zellen Antigen-spezifisch aktivieren können.

Unreife dendritische Zellen befinden sich vor allem im peripheren Gewebe - auf der Suche nach möglichen Pathogenen und Infektionsherden. Sie sind spezialisiert auf die Antigen-(Ag-) Aufnahme und -Prozessierung. Entsprechend ihrer Funktion weisen unreife dendritische Zellen eine starke Expression von Endozytose-Rezeptoren und hohe Phagozytoseaktivität auf, exprimieren aber nur in geringem Maß Ag-präsentierende und kostimulatorische Moleküle. Nach Ag-Aufnahme wandern DC in die umliegenden Lymphknoten, verlieren gleichzeitig ihre Phagozytoseaktivität und verändern ihren Phänotyp. Sie zeigen nun eine starke Expression an MHC-I- und MHC-II-Molekülen, die sie zur Präsentation der aufgenommenen Fremdpeptide befähigen. Außerdem exprimieren sie kostimulatorische B7-Moleküle (CD80, CD86), über die sie in direkten Zellkontakt mit T-Zellen treten können. Die Wanderung der DC aus dem peripheren Gewebe in die Lymphknoten sowie ihre phänotypische und funktionelle Differenzierung (sogenannte *Reifung*) werden durch Gefahrensignale initiiert. Als Gefahren- bzw. Reifesignale wirken inflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), die Erkennung eines eindringenden Pathogens (z.B. LPS, bakterielle DNA, dsRNA) über einen *Pattern Recognition Rezeptor* (PRR) oder der direkte Zellkontakt zwischen DC und T-Zelle (z.B. CD40/CD40L-, B7/CD28-Interaktion). Erfahren unreife DC nach Ag-Aufnahme und -Prozessierung keine Ausreifung, kommt es zu einer Toleranzinduktion durch die DC und die Immunantwort stagniert. Reife DC dagegen sind auf die Ag-Präsentation und Ag-spezifische Aktivierung naiver T-Zellen spezialisiert (= *Priming*, s. 1.5). In den Lymphknoten treffen die reifen DC auf naive T-Lymphozyten und präsentieren diesen Antigene (Signal 1). Zusätzlich vermitteln DC - durch Bindung von B7-Molekülen bzw. CD40 an CD28-Moleküle bzw. CD40L auf der T-Zelle - ein zweites, kostimulatorisches Signal (Signal 2), das die klonale

Expansion der spezifischen T-Zellen initiiert. Folglich kontrollieren DC die Entstehung einer spezifischen T-Zell-Immunität und stellen das entscheidende Bindeglied zwischen dem angeborenen (unspezifischen) und erworbenen (spezifischen) Immunsystem dar (Steinman, 1991; Banchereau, 2000).

### *Subpopulationen dendritischer Zellen*

Basierend auf verschiedenen Merkmalen, wie Abstammung, Oberflächenmarker, Vorkommen und teilweise ihrer Funktion, unterscheidet man im humanen System drei verschiedene DC-Subtypen: 1) Langerhans-Zellen; 2) Interstitielle DC oder Myeloide DC (MDC); 3) Plasmazytoide DC (PDC). Wahrscheinlich stammen alle DC-Subtypen ursprünglich von  $CD34^+$  hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarkes ab, die im weiteren Verlauf zu  $CD34^+$  myeloiden und  $CD34^+$  lymphoiden Vorläuferzellen differenzieren. Die  $CD34^+$ ,  $CD11c^+$  myeloiden Vorläuferzellen reifen zu interstitiellen oder myeloiden DC bzw. den Langerhans-Zellen in der Haut heran, während die  $CD34^+$ ,  $CD11c^-$  lymphoiden Vorläuferzellen zu plasmazytoiden DC differenzieren (Banchereau, 2000; Liu, 2001).

### *Dendritische Zellen im peripheren Blut*

Humane dendritische Zellen im peripheren Blut (*blood dendritic cells*, BDC) stellen eine heterogene Gruppe von Zellen dar bestehend aus mindestens zwei Subpopulationen, die sich in phänotypischen und funktionellen Merkmalen unterscheiden. Allen BDC fehlen die Leukozyten-spezifischen Zellreihen-Marker CD3, CD14, CD19, CD56 (= *lineage-negative*); ihnen gemeinsam ist die Expression der Oberflächenmarker HLA-DR, CD4 und CD33. Die lineage-negativen ( $lin^-$ ), HLA-DR-positiven BDC lassen sich weiter auftrennen in  $CD11c^+$  myeloide DC ( $lin^-/HLA-DR^+/CD11c^+$  MDC) und  $CD11c^-/CD123^+$  plasmazytoide DC ( $lin^-/HLA-DR^+/CD123^+$  PDC) (O'Doherty, 1994; Olweus, 1997).

#### 1.5.2 Myeloide dendritische Zellen: *Klassische DC*

$CD11c^+$  *blood dendritic cells* (=myeloide DC, MDC) differenzieren in Kultur in Gegenwart von Zytokinen spontan zu typischen, reifen DC. Ein *in vitro*-Modell für MDC sind die aus Monozyten mit GM-CSF (*granulocyte-macrophage-colony stimulating factor*) und IL-4 generierten unreifen DC (mono-DC), die sich mithilfe mikrobieller Stimuli (z.B. LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) zu reifen mono-DC differenzieren lassen. Anhand *in vitro* generierter mono-DC wurden die immunologischen Eigenschaften von MDC, i.e. Ag-Aufnahme, Ag-Prozessierung und Ag-Präsentation sowie die Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation, untersucht. MDC verfügen über mehrere Rezeptoren, mit denen sie Ag aufnehmen können, i.e. Mannose-Rezeptoren, DC-SIGN und Fc-Rezeptoren (Colonna,

2002). Nach Wechselwirkung mit aktivierten T-Zellen über kostimulatorische Moleküle, insbesondere CD40 bzw. B7-Moleküle auf MDC und CD40L bzw. CD28 auf aktivierten T-Zellen, initiieren MDC die klonale Expansion spezifischer T-Zellen und produzieren IL-12, wodurch eine Th1-gerichtete Differenzierung naiver T-Zellen gefördert wird. Sie unterscheiden sich von plasmazytoiden Zellen (PDC) sehr wesentlich in ihrer TLR-Expression, wodurch MDC andere mikrobielle Bestandteile erkennen als PDC. Im Gegensatz zu PDC exprimieren MDC kein TLR9 und reagieren somit nicht auf Stimulation mit CpG-DNA (Krug, 2001b).

### 1.5.3 Plasmazytoide dendritische Zellen: *Zwischen Interferon-produzierenden Zellen und DC*

$CD123^+$  (=  $IL-3R\alpha^+$ ) *Blood Dendritic Cells* (= plasmazytoide DC, PDC) sind identisch mit der seit längerem bekannten, jedoch ungenau charakterisierten Interferon- $\alpha$ -produzierenden Zelle (IPC), die als Hauptproduzent von IFN- $\alpha$  in der frühen Phase viraler Infektionen beschrieben wurde (Fitzgerald-Bocarsly, 1993; Cella, 1999; Siegal, 1999). Neben Typ-I-IFN (IFN- $\alpha/\beta$ ) können PDC eine Reihe anderer inflammatorischer Zytokine und Chemokine produzieren, wie IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IP-10 (Bauer, 2001; Krug, 2001b). Nach Erkennung bestimmter mikrobieller Stimuli, wie CpG-DNA, beobachtet man - wie bei MDC - eine Ausreifung der PDC, gekennzeichnet durch morphologische Veränderungen (Entwicklung von Ausläufern (Dendriten)) sowie erhöhte Expression von MHC-Molekülen, kostimulatorischen Molekülen und des Lymphknoten-Homing-Rezeptors CCR7 (Hartmann, 1999; Krug, 2001b). Reife PDC besitzen neben der typischen dendritischen Morphologie potente T-Zell-stimulatorische Fähigkeiten (Grouard, 1997; Cella, 2000). Sie exprimieren den C-Typ-Lectin-Rezeptor BDCA-2, der für die Aufnahme von Ag verantwortlich sein könnte (Dzionic, 2001).

Ihre Einordnung als "DC" beruht darauf, dass reife PDC neben ihrer sekretorischen Funktion eine typische dendritische Morphologie besitzen und allogene T-Zellen zur Proliferation bringen (Hartmann, 1999; Cella, 2000; Rothenfusser, 2002). Die Einordnung der PDC als dendritische Zellen ist dennoch bis heute umstritten. Bisher fehlen Daten, ob PDC Antigen phagozytieren, prozessieren und T-Zellen Antigen-spezifisch primen können, was ihre Einteilung als klassische DC rechtfertigen würde.

## 1.6 T-Lymphozyten

Circa 80 Prozent der Lymphozyten im peripheren Blut sind T(Thymus)-Lymphozyten, die in ihrer Entwicklung einen Reifungsprozess im Thymus durchlaufen. Die Abwehrfunktion von T-Zellen

beruht darauf, dass sie Zellen, die ein Pathogen internalisiert haben und Fremdpeptid/MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche tragen, über ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor erkennen. Der aus zwei Ketten zusammengesetzte T-Zell-Rezeptor (TCR) ist das charakteristische Merkmal von T-Zellen. Die Vielfalt des antigen-spezifischen TCR-Repertoires im Immunsystems von Vertebraten wird dadurch erzeugt, dass die Gene für die TCR-Ketten in jeder Zelle einem somatischen Rekombinationsprozess unterworfen sind.

### *Kombinationsdiversität des T-Zell-Rezeptors (TCR)*

Der im Laufe der Differenzierung der T-Lymphozyten stattfindende Rekombinationsvorgang zur Generierung eines Antigenrezeptors führt zur Zusammensetzung von jeweils mehreren möglichen, entlang eines großen Genlocus verstreut liegenden V-(*variable*), D-(*diversity*), J-(*joining*) und C-(*constant*) Gensegmenten zu einem einzelnen, transkribierbaren Gen. Die Vielfalt, die sich allein durch die unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten dieser Gensegmente ergibt (die sogenannte Kombinationsdiversität), ist bei  $\alpha/\beta$  T-Zellen mit etwa 50 V-Segmenten pro Kette bereits enorm hoch. Zusätzlich kann das Enzym TDT (Terminale Desoxynukleotid-Transferase) durch Entfernen endständiger Nukleotide und zufälligen Einbau einiger zusätzlicher, nicht im Genom kodierter sogenannter N-Nukleotide zwischen den einzelnen Segmenten die Vielfalt noch steigern. T-Zellen enthalten vier solcher Genloci, die potentiell rearrangieren können und die wie ihre Genprodukte  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  benannt sind. Nach dem Reifungsprozess im Thymus tragen 95% der T-Zellen einen aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette zusammengesetzten TCR, die restlichen, etwa 5% der T-Zellen exprimieren einen aus einer  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette bestehenden TCR.

### *$\alpha/\beta$ T-Zellen*

Reife  $\alpha/\beta$  T-Zellen tragen entweder den CD4 oder CD8 Korezeptor. Mit ihrem durch das Genarrangement jeweils einzigartigen TCR können  $\alpha/\beta$  T-Zellen Antigene spezifisch erkennen. Für  $\alpha/\beta$  T-Zellen sind Antigene definiert als Fremd-Peptide gebunden an MHC-I-Moleküle bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen bzw. Fremdpeptide gebunden an MHC-II-Moleküle bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Dies ist die Folge eines Selektionsprozesses im Thymus, der nur  $\alpha/\beta$  T-Zellen mit TCR zulässt, die mit geringer Affinität an die eigenen MHC-Moleküle binden (positive Selektion/ MHC-Restriktion), jedoch Rezeptoren, die spezifisch für MHC/Selbst-Peptid-Komplexe sind, ausschließt (negative Selektion). Die diesen Selektionsprozess überstehenden Zellen sind spezifisch für Fremd-Peptide, präsentiert durch die eigenen MHC-Moleküle und damit MHC-restringiert.



### *Priming von $\alpha/\beta$ T-Zellen*

Für eine vollständige erste Aktivierung benötigen naive  $\alpha/\beta$  T-Zellen neben der Erkennung eines spezifischen Liganden über ihren TCR (=Signal 1) gleichzeitig ein zweites, kostimulatorisches Signal (=Signal 2) vermittelt durch kostimulatorische Moleküle (z.B. B7, CD40) auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, die an bestimmte Oberflächenmoleküle auf T-Zellen binden (s. CD28, CD40L). Nach diesem als *Priming* bezeichneten Vorgang der ersten Aktivierung naiver T-Zellen proliferiert die ursprüngliche einzelne T-Zelle (klonale Expansion) und differenziert zu Effektorzellen, bevor sie eine effektive Immunantwort bewirken kann.

### *Effektormechanismen der $\alpha/\beta$ T-Zellen*

Das Immunsystem von Vertebraten verfügt über verschiedene Strategien, um intra- bzw. extrazelluläre Pathogene zu bekämpfen. Viren und einige intrazelluläre Bakterien, die körpereigene Zellen infizieren und sich anschließend im Zytosol replizieren, werden durch Lyse der infizierten Körperzelle mithilfe von  $CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen beseitigt. Bakterien und Parasiten, die über Phagozytose oder Endozytose von einer APC aufgenommen werden, replizieren sich in Endosomen und Lysosomen. Solche in Vesikel eingeschlossene Pathogene werden mithilfe von  $CD4^+$  T-Zellen bekämpft.  $CD4^+$  T-Zellen leiten je nach Art des eingedrungenen Pathogens eine Th1- bzw. Th2-Immunantwort ein. Th1-Zellen aktivieren Makrophagen, das von ihnen phagozytierte Pathogen zu töten; Th2-Zellen aktivieren B-Zellen zur Produktion Ag-spezifischer Immunglobuline.  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen erkennen die Art des eingedrungenen Pathogens an der MHC-Klasse (I bzw. II), über die das Fremdpeptid auf der APC-Oberfläche präsentiert wird.

### *Memory-T-Zellen*

Die Anzahl Antigen-spezifischer T-Zellen steigt während einer Infektion sehr stark an und fällt nach Abklingen der Infektion erneut ab - unter Umständen auf ein Hundertstel des Maximalwertes während der Infektion. Dennoch liegt die Anzahl spezifischer T-Zellen nach Abklingen der Infektion deutlich höher als vor dem Priming. Die verbleibenden T-Zellen sind langlebige voraktivierte T-Zellen, die charakteristische Aktivierungsmarker, z.B. CD45RO, exprimieren. Auf Restimulation mit dem entsprechenden Antigen reagieren diese T-Zellen sensitiver als naive T-Zellen und übernehmen schnell und effektiv Effektorfunktionen. Man bezeichnet diese voraktivierten T-Zellen daher als Memory-T-Zellen. Aufgrund ihrer im Vergleich zu naiven T-Zellen höheren Frequenz und leichteren Aktivierbarkeit machen sie den Organismus gegenüber einer erneuten Infektion mit demselben Erreger resistent.

## 1.7 Natürliche Killer T(NKT)-Zellen

### *Effektoren in der Initialphase einer Immunantwort*

Natürliche Killer T (NKT)-Zellen sind eine kleine, erst seit kurzem bekannte Lymphozyten-Subpopulation, deren physiologische Funktion bisher weitgehend unbekannt ist (Lantz, 1994). Ihre Bezeichnung als "NKT"-Zellen beruht darauf, dass sie phänotypische und funktionelle Eigenschaften von NK-Zellen und  $\alpha/\beta$  T-Zellen teilen. NKT-Zellen exprimieren einen semi-invarianten  $\alpha/\beta$  TCR, über den sie bestimmte Glykolipid-Antigene spezifisch erkennen. NKT-Zellen werden - ähnlich wie NK-Zellen - in der Initialphase einer Immunantwort aktiviert und induzieren durch Zytokinausschüttung sekundär die Aktivierung anderer Immunzellen der angeborenen und erworbenen Immunität. Sie können dadurch eine entstehende Immunantwort (ähnlich einem Adjuvans) entscheidend modifizieren.

### 1.7.2 Entdeckung muriner $V\alpha 14^+$ NKT-Zellen

Im Jahr 1986 isolierte die Arbeitsgruppe um Taniguchi eher zufällig die cDNA der invarianten  $V\alpha 14$ -Rezeptorkette aus murinen Suppressor-T-Hybridomzellen (Imai, 1986). Einige Jahre später identifizierten Lantz und Bendelac eine murine T-Zell-Population, die einheitlich diese invariante  $\alpha$ -Kette in ihrem TCR exprimiert (Lantz, 1994).  $V\alpha 14^+$  T-Zellen tragen entweder keinen Korezeptor ( $CD4^-/CD8^-$  doppelt negativ) oder nur den  $CD4^+$  Korezeptor ( $CD4^+/CD8^-$ ). Neben einem aktivierten Memory-T-Zell-Phänotyp ( $CD44^+$ ) exprimieren  $V\alpha 14^+$  T-Zellen den murinen NK-Zellmarker NK1.1. Eine andere Besonderheit der  $V\alpha 14^+$  T-Zellen ist, dass sie nicht-polymorphe, MHC-I-ähnliche CD1d-Moleküle erkennen (Bendelac, 1995).

Der TCR dieser T-Zell-Population setzt sich aus einer invarianten  $\alpha$ -Kette und einer  $\beta$ -Region mit begrenzter Variabilität zusammen. Die  $V\alpha 14$ -Kette des TCR ist fast ausschließlich mit einer bestimmten J-Region (J281) assoziiert (invariante  $V\alpha 14$ -J281-Region) (Lantz, 1994).  $V\alpha 14$  ist überwiegend an eine bestimmte  $\beta$ -Kette gebunden:  $V\beta 8$ . Mit der  $\beta$ -Kette können unterschiedliche J-Regionen assoziiert sein. Insgesamt wird der TCR dieser Zellen daher als "*semi-invariant*" bezeichnet.

Die neue murine Zellpopulation mit semi-invariantem TCR und gleichzeitiger NK1.1-Expression wurde von ihren Entdeckern als  $V\alpha 14^+$  NKT-Zell-Population bezeichnet (Taniguchi, 2003).  $V\alpha 14^+$  NKT-Zellen kommen in der Maus vor allem in der Leber (20-30% der hepatischen Lymphozyten), im Knochenmark und im Thymus vor, zu kleineren Prozentsätzen auch in der Milz und im peripheren Blut (Biron, 2001).

### 1.7.3 Humane V $\alpha$ 24<sup>+</sup> NKT-Zellen

#### *Strukturelle Homologie zu murinen NKT-Zellen*

Lantz und Bendelac identifizierten im humanen System eine den murinen V $\alpha$ 14<sup>+</sup> NKT-Zellen phänotypisch und funktionell sehr ähnliche Zellfraktion, die V $\alpha$ 24<sup>+</sup>/V $\beta$ 11<sup>+</sup> NKT-Zellen (Lantz, 1994). Entsprechend ihren murinen Homologen exprimieren humane NKT-Zellen eine invariante  $\alpha$ -Kette (V $\alpha$ 24) und sind entweder CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> doppelt negativ (=DN) oder CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> (Dellabona, 1994). Die cDNA-Sequenzierung der murinen V $\alpha$ 14-Kette und der humanen V $\alpha$ 24-Kette zeigte eine erstaunlich hohe Homologie zwischen den beiden Spezies (Lantz, 1994). Auch V $\alpha$ 24 ist überwiegend mit einer bestimmten J-Region assoziiert (J $\alpha$ 18), welche wiederum der murinen J281-Region strukturell sehr ähnlich ist. Die überwiegend mit V $\alpha$ 24 assoziierte  $\beta$ -Kette V $\beta$ 11 weist eine sehr ähnliche cDNA-Sequenz wie die murine V $\beta$ 8-Kette auf. Wie ihre murinen Homologe besitzen humane V $\alpha$ 24<sup>+</sup> NKT-Zellen einen aktivierten Memory-Phänotyp (CD45R0<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> (D'Andrea, 2000)) und exprimieren NK-Rezeptoren (NKR1A=CD161 (Loza, 2002), NKG2D (Vivier, 2002)).

#### *Funktionelle Homologie zu murinen NKT-Zellen*

Sowohl in der Maus als auch im Menschen erkennen NKT-Zellen über ihren TCR bestimmte Glykolipid-Antigene, wenn diese an nicht-polymorphe MHC-I-ähnliche CD1d-Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen gebunden sind (Exley, 1997; Kawano, 1997). Prototyp eines solchen Glykolipid-Antigens ist  $\alpha$ -Galaktosylceramid ( $\alpha$ -GalCer, s. 1.6.6). Murine und auch humane NKT-Zellen erkennen CD1d-gebundenes  $\alpha$ -GalCer (Brossay, 1998).

Die erstaunlich hohe, über die Evolution hinweg erhaltene strukturelle und funktionelle Homologie von NKT-Zellen in Maus und Mensch ( $\alpha/\beta$  TCR-Ketten,  $\alpha$ -GalCer-Erkennung) lässt vermuten, dass NKT-Zellen wichtige Abwehrfunktionen innerhalb des Immunsystems von Vertebraten innehaben.

#### 1.7.4 Physiologische Funktion von NKT-Zellen

##### *NKT-Zellen üben regulatorische Funktionen innerhalb des Immunsystems aus*

NKT-Zellen sind Th0-Zellen, die bei Antigen-Kontakt Th1- und Th2-Zytokine produzieren können (z.B. IFN- $\gamma$  und IL-4) (Bendelac, 1997; Godfrey, 2000). In Abhängigkeit von der Kostimulation im Rahmen der Antigen-Erkennung differenzieren NKT-Zellen in Richtung Th1 oder in Richtung Th2. Inzwischen ist gut belegt, dass NKT-Zellen wichtige regulatorische Funktionen innerhalb der angeborenen und adaptiven Immunität besitzen (Taniguchi, 2003). NKT-Zellen werden in der Initialphase einer Immunantwort aktiviert und regulieren über Zytokine, vor allem IFN- $\gamma$  und IL-4, andere Immunzellen, wie NK-Zellen, dendritische Zellen, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen (Carnaud, 1999; Kitamura, 1999; Godfrey, 2000; Nishimura, 2000). Damit initiieren und regulieren sie Immunreaktionen der angeborenen und adaptiven Immunität. Tabelle 2 fasst - ohne den Anspruch auf Vollständigkeit - die wichtigsten Erkrankungen zusammen, bei denen die Beteiligung von NKT-Zellen an einer protektiven Immunantwort nachgewiesen wurde. Ein in diesem Jahr erschienener Übersichtsartikel von Taniguchi beschreibt ausführlich den aktuellen Kenntnisstand über die Beteiligung von NKT-Zellen an Immunreaktionen (Taniguchi, 2003).

Es gibt eine Vielzahl von Hinweisen, dass NKT-Zellen die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verhindern können. Die Daten hierzu stammen bisher in erster Linie aus Tiermodellen. *Nonobese diabetic* (NOD-) Mäuse entwickeln spontan einen Typ-I-Diabetes. NKT-Zellen sind in diesen Mäusen stark vermindert, und die verbleibenden NKT-Zellen sind nicht in der Lage, IL-4 zu produzieren (Gombert, 1996). Durch Transfer von normalen NKT-Zellen in NOD-Mäuse kann die Entwicklung des Diabetes verhindert werden (Hammond, 1998). In verschiedenen Transplantations-Modellen sind NKT-Zellen an der Toleranzentwicklung gegenüber Allo- bzw. Xenograft-Transplantaten beteiligt (Ikehara, 2000; Seino, 2001; Sonoda, 2002). Man nimmt an, dass NKT-Zellen über die Ausschüttung von immunsupprimierenden Zytokinen (z.B. IL-10) oder/und durch Induktion von regulatorischen T-Zellen eine Immunantwort bei Autoimmunerkrankungen supprimieren bzw. gegenüber einem Transplantat Toleranz induzieren können (Sonoda, 2001; Takeda, 2000). Interessanterweise sind bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen (Typ-I-Diabetes, Lupus erythematodes, systemische Sklerose, Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis) ebenfalls verminderte NKT-Zellzahlen und Funktionsverluste der NKT-Zellen beschrieben worden (Sumida, 1995; Wilson, 1998; Illes, 2000; Wilson, 2000; Gausling, 2001; Kojo, 2001; Kukreja, 2002).

**Tab. 2: Beteiligung von NKT-Zellen an protektiven Immunantworten (nach (Godfrey, 2000)).**

Erkrankung	Referenz
<p><b>Autoimmunerkrankungen</b></p> <p><i>Typ-I-Diabetes</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verminderte NKT-Zell-Frequenz und -Funktion in NOD-Mäusen und Typ-I-Diabetes-Patienten; NKT-Zellen von NOD-Mäusen u. Typ-I-Diabetes-Patienten weisen Defekt in IL-4-Produktion auf.</li> <li>• Transfer von NKT-Zellen in NOD-Mäuse schützt vor Diabetes-Entwicklung (vermutlich durch Sekretion von IL-4 und IL-10).</li> </ul> <p><i>Lupus erythematoses</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausbruch der Krankheit in MRL/lpr Mäusen<sup>1</sup> korreliert mit Verlust der NKT-Zellen.</li> <li>• Transfer von NKT-Zellen in MRL/lpr Mäuse<sup>1</sup> schützt vor Lupus-Entwicklung.</li> <li>• Verminderte NKT-Zell-Frequenz in Lupus-Patienten.</li> </ul> <p><i>Systemische Sklerose</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verminderte NKT-Zell-Frequenz in Sklerose-Patienten.</li> </ul> <p><i>Multiple Sklerose</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verminderte NKT-Zell-Frequenz in MS-Patienten.</li> </ul> <p><i>Rheumatoide Arthritis</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verminderte NKT-Zell-Frequenz in Patienten mit Rheumatoider Arthritis.</li> </ul>	<p>(Gombert, 1996; Godfrey, 1997; Lehuen, 1998; Wilson, 1998; Kukreja, 2002, Wilson, 2000) (Hammond, 1998; Lehuen, 1998)</p> <p>(Takeda, 1993; Mieza, 1996)</p> <p>(Kojo, 2001)</p> <p>(Sumida, 1995)</p> <p>(Illes, 2000; Gausling, 2001)</p> <p>(Kojo, 2001)</p>
<p><b>Infektionskrankheiten</b></p> <p><i>Toxoplasmose</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• NKT-Zellen verstärken die Funktion von spezifischen CD8<sup>+</sup> CTL gegen <i>Toxoplasma gondii</i> (Maus).</li> </ul> <p><i>Mykobakterien</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• NKT-Zellen bei Tuberkulose-Infektion an Granulom-Formation und IFN-<math>\gamma</math>-Ausschüttung beteiligt (Maus).</li> </ul> <p><i>Plasmodien</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• NKT-Zellen hemmen direkt das Wachstum der Plasmodien in der Leber, vermutlich über IFN-<math>\gamma</math>-Sekretion (Maus).</li> </ul>	<p>(Denkers, 1996)</p> <p>(Apostolou, 1999)</p> <p>(Gonzalez-Aseguinolaza, 2000; Pied, 2000; Mannoor, 2001)</p>
<p><b>Tumore</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• NKT-Zellen hemmen Tumorstadium durch direkte Zytotoxizität bzw. Ausschüttung von IFN-<math>\gamma</math> (Maus).</li> </ul>	<p>(Hashimoto, 1995; Takeda, 1996; Yamaguchi, 1996; Cui, 1997; Nakagawa, 1998; Kawano, 1999; Smyth, 2002)</p>
<p><b>Toleranz</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• NKT-Zellen vermitteln Toleranz im ACAID-Modell durch Ausschüttung von IL-10 und Induktion von regulatorischen T-Zellen (Maus). ACAID=<i>Anterior-chamber-associated immune deviation</i>.</li> <li>• NKT-Zellen unterdrücken Abstoßungsreaktion nach Allo- bzw. Xenograft-Transplantation (Maus); Transfer von NKT-Zellen in NKT-Zell-Knock out (KO)-Mäuse vermittelt Akzeptanz der Transplantate.</li> </ul>	<p>(Sonoda, 2001; Sonoda, 2002)</p> <p>(Seino, 2001; Ikehara, 2000)</p>

<sup>1</sup> *MRL/lpr Mäuse*, MRL/lpr-Mäuse entwickeln aufgrund eines genetischen Defekts des Fas-Rezeptors (und daraus resultierender abnormaler Apoptose) spontan einen systemischen Lupus erythematoses.

Über die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  und wahrscheinlich direkte Zytotoxizität sind NKT-Zellen in der Maus an Abwehrreaktionen gegen Infektionen und Tumore beteiligt (Hashimoto, 1995; Denkers, 1996; Takeda, 1996; Yamaguchi, 1996; Kawano, 1998; Apostolou, 1999; Godfrey, 2000; Gonzalez-Aseguinolaza, 2000; Pied, 2000; Mannoor, 2001; Smyth, 2002). Ein Teil der nach selektiver NKT-Zellstimulation durch  $\alpha$ -GalCer *in vivo* beobachteten zytotoxischen Effekte kommt jedoch wahrscheinlich durch sekundäre Aktivierung anderer Effektorzellen, vor allem NK-Zellen, zustande (Biron, 2001). Auch humane NKT-Zellen übten *in vitro* nach Aktivierung mit dem spezifischen Glykolipid-Antigen  $\alpha$ -GalCer gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien direkte Zytotoxizität aus (Kawano, 1999; Nicol, 2000).

Erste Literaturberichte weisen darauf hin, dass eine Fehlregulation von NKT-Zellen die Ursache für einen Immundefekt sein kann. So sollen NKT-Zellen die Ausbildung einer antitumoralen Immunantwort supprimiert (Terabe, 2000) bzw. die Entwicklung von Autoimmungeschehen induziert haben (Kaneko, 2000; Takeda, 2000). Diese Berichte verdeutlichen auf dramatische Weise, welches regulatorische Potential NKT-Zellen aufweisen. Fasst man die bisherigen Erkenntnisse über die Funktion von NKT-Zellen zusammen, eröffnen sich interessante Strategien für eine NKT-Zell-basierte Immuntherapie. Möglicherweise kann die Funktion von NKT-Zellen über spezifische Liganden gezielt moduliert werden, um eine Immunreaktion bei Autoimmunerkrankungen, Infektionen und Tumoren zu regulieren.

#### *Präferentielle Abwehrfunktion in der Leber?*

NKT-Zellen kommen nur in sehr niedrigen Prozentsätzen im Vertebraten-Organismus vor, s. 0,2% im humanen peripheren Blut (eigene Daten). Bemerkenswerterweise akkumulieren vor allem murine, aber auch humane NKT-Zellen in der Leber, einem Ort, der besonders vielen Fremdstoffen und Pathogenen ausgesetzt ist (Anteil der NKT-Zellen an Gesamt-T-Zellen in der Leber: 20-30% in der Maus bzw. 4% im Menschen) (Ishihara, 1999; Norris, 1999; Biron, 2001). Daher liegt der Schluss nahe, dass NKT-Zellen an ihrer präferentiellen Lokalisation, der Leber, eine besondere Abwehrfunktion innehaben.

#### 1.7.5 Entwicklung von NKT-Zellen

##### *Pre-Commitment- und Mainstream-Modell*

Die Entwicklung von NKT-Zellen konnte bisher nur ansatzweise geklärt werden. Es gibt bis dato zwei grundsätzliche Modelle, wie NKT-Zellen entstehen: Das „*Pre-Commitment-Modell*“ und das „*Mainstream*“-Modell“ (MacDonald 2002).

Nach dem sogenannten „*Pre-Commitment-Modell*“ stammen NKT-Zellen - anders als konventionelle T-Zellen - von einer eigenen separaten Vorläufer-T-Zelle ab, deren Rezeptorketten bereits genetisch determiniert sind (Sato, 1999). Gegen dieses Modell sprechen Untersuchungen, nach denen das Rearrangement des semi-invarianten TCR von NKT-Zellen nicht mit höherer Wahrscheinlichkeit als bei konventionellen  $\alpha/\beta$  T-Zellen stattfindet, sondern zufällig (Lantz, 1994; Shimamura, 1997).

In letzter Zeit geht man daher von dem sogenannten *Mainstream-Modell* aus. Nach dem *Mainstream-Modell* entstehen NKT-Zellen – wie konventionelle  $\alpha/\beta$  T-Zellen - aus normalen Vorläufer-Thymozyten (Bendelac, 1997). Nach zufälligem Rearrangement der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten exprimiert zunächst eine sehr kleine Population von Vorläufer-Thymozyten den semi-invarianten TCR der NKT-Zellen (Gapin, 2001). In  $\beta 2M$ -defizienten (Mäuse ohne intakte MHC-I- und CD1d-Moleküle) und CD1d-defizienten Mäusen findet man eine verminderte Anzahl von NKT-Zellen (Ohteki, 1994; Adachi, 1995; Chen, 1997). Daher nimmt man an, dass murine  $V\alpha 14^+$  NKT-Zellen durch spezifische Interaktion zwischen ihrem TCR und CD1d-Molekülen positiv selektioniert werden.  $CD8^+$  NKT-Zellen werden wahrscheinlich - im Gegensatz zu  $CD4^+$  oder  $CD4^+/CD8^-$  doppelt negativen NKT-Zellen - durch negative Selektion eliminiert (vermutlich aufgrund zu hoher Affinität der  $CD8^+$  NKT-Zellen zu einem autologen, CD1d-gebundenen Antigen) (Bendelac, 1994). Die im Vergleich zu konventionellen spezifischen T-Zellen hohe Frequenz der NKT-Zellen könnte – nach dem *Mainstream-Modell* - durch häufige Begegnung eines spezifischen CD1d-restringierten Liganden und selektive Proliferation zustande kommen. Bisher konnte jedoch noch kein körpereigener NKT-Zell-spezifischer CD1d-Ligand identifiziert werden.

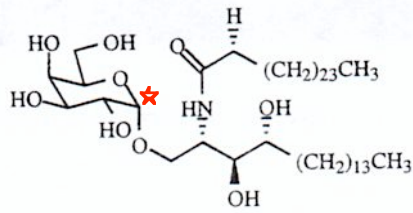
#### 1.7.6 Das CD1d-restringierte, NKT-Zell-spezifische Antigen $\alpha$ -Galaktosylceramid

##### *Entdeckung der antitumoralen Aktivität von $\alpha$ -Galaktosylceramid*

Die Substanz  $\alpha$ -Galaktosylceramid ( $\alpha$ -GalCer) wurde zunächst - unabhängig von NKT-Zellen – bei einem Screening-Test auf antitumorale Wirkstoffe entdeckt. In B16-Melanom-tragenden Mäusen hemmte  $\alpha$ -GalCer das Tumorstadium und bewirkte eine Rückbildung von Metastasen (Kobayashi, 1995). Ursprünglich wurde  $\alpha$ -GalCer aus einem Meeresschwamm (*Agelas mauritanicus*) isoliert. Zur experimentellen Verwendung sowie für präklinische und klinische Studien wird  $\alpha$ -GalCer inzwischen synthetisch hergestellt.

$\alpha$ -GalCer ist ein Glykolipid, dessen 1`C-Atom am Zuckerrest über eine  $\alpha$ -anomerische Verknüpfung an den Lipidrest gebunden ist (Abb. 1). Durch diese Stereochemie unterscheidet sich  $\alpha$ -GalCer von körpereigenen Glykolipiden des Säugetier-Organismus: Unter physiologischen

Bedingungen kann nur eine  $\beta$ -anomerische Verknüpfung gebildet werden, da das nötige Enzym für eine  $\alpha$ -Verknüpfung fehlt. Folglich kann  $\alpha$ -GalCer kein körpereigenes Glykolipid des Säugetier-Organismus sein.



**Abb. 1: Strukturformel von  $\alpha$ -Galaktosylceramid (aus (Wilson, 2002)).** ☆ kennzeichnet das asymmetrische,  $\alpha$ -anomerisch verknüpfte 1' C-Atom.

### *$\alpha$ -GalCer als CD1d-restringierter, spezifischer Ligand von NKT-Zellen*

Im Jahr 1997 identifizierte Kawano  $\alpha$ -GalCer als einen spezifischen Liganden für murine  $V\alpha 14^+$  NKT-Zellen (Kawano, 1997). Den NKT-Zellen wird  $\alpha$ -GalCer gebunden an MHC-I-ähnliche CD1d-Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert (Kawano, 1997). Die Erkennung von CD1d-gebundenem  $\alpha$ -GalCer ist offenbar über die Evolution stark konserviert, da auch humane  $V\alpha 24^+$  NKT-Zellen CD1d-gebundenes  $\alpha$ -GalCer erkennen (Brossay, 1998).

Bisher konnte kein natürlicher oder körpereigener Ligand von NKT-Zellen identifiziert werden. Man nimmt an, dass  $\alpha$ -GalCer einen körpereigenen Liganden imitiert. Der über die Evolution konservierte Erkennungsmechanismus von  $\alpha$ -GalCer legt den Schluss nahe, dass das Immunsystem von Vertebraten im Laufe des Lebens mit hoher Wahrscheinlichkeit auf  $\alpha$ -GalCer-ähnliche Antigene trifft. Strukturell ähnliche Glykolipid-Antigene sind in bestimmten Bakterien, in Fetten, auf Tumorzellen, auf Zellen des Nieren- und Intestinal-Trakts sowie in bestimmten Zellkulturen gefunden worden (Watanabe, 1976; Kawano, 1997). Möglicherweise werden  $\alpha$ -GalCer-ähnliche Glykolipid-Strukturen von bestimmten Pathogenen exprimiert oder entstehen durch Mutation von körpereigenen Zellen oder Tumorzellen (Kawano, 1997).

Die Identifizierung eines spezifischen Antigens von NKT-Zellen, des Glykolipids  $\alpha$ -GalCer, und dessen Anwendung in tierexperimentellen Studien führte zu weiteren Erkenntnissen über die Funktion von NKT-Zellen.



### *$\alpha$ -GalCer in der Immuntherapie von Tumoren*

In verschiedenen Mausmodellen hat  $\alpha$ -GalCer in den letzten Jahren beeindruckende antitumorale Aktivität gezeigt. Eine der ersten Arbeiten hierzu stammte von der Arbeitsgruppe um Nakagawa und demonstrierte, dass die Injektion von  $\alpha$ -GalCer die Rückbildung von Lebermetastasen eines Colon26-Adenokarzinoms in Mäusen bewirkt (Nakagawa, 1998). Kawano zeigte, dass murine  $V\alpha 14^+$  NKT-Zellen an der  $\alpha$ -GalCer-induzierten, antitumoralen Aktivität beteiligt sind (Kawano, 1998). Demnach aktiviert  $\alpha$ -GalCer spezifisch  $V\alpha 14^+$  NKT-Zellen, die als Konsequenz zytotoxische Effektorfunktion gegenüber Tumorzellen übernehmen. Da NKT-Zellen bereits in der Initialphase ihrer Aktivierung hohe Mengen an IFN- $\gamma$  ausschütten, aktivieren sie sekundär auch konventionelle NK-Zellen und  $CD8^+$  T-Zellen. Deshalb geht man davon aus, dass NK-Zellen und  $CD8^+$  T-Zellen nach  $\alpha$ -GalCer-Behandlung ebenfalls zytotoxische Effektorfunktionen übernehmen und damit zu der  $\alpha$ -GalCer-induzierten antitumoralen Wirkung beitragen (Biron, 2001).

Die Daten aus murinen Studien stimmen optimistisch, dass  $\alpha$ -GalCer potente Fähigkeiten zur Immuntherapie von Tumoren besitzt. Die erste klinische Studie mit  $\alpha$ -GalCer zur Behandlung von soliden Tumoren ist im Jahr 2002 angelaufen (Giaccone, 2002).

### *$\alpha$ -GalCer als Adjuvans*

Im Jahr 2002 demonstrierte die Arbeitsgruppe um Gonzalez-Aseguinolaza in einer murinen Vakzinierungsstudie, dass  $\alpha$ -GalCer als Adjuvans die T-Zell-vermittelte Immunität verstärken kann (Gonzalez-Aseguinolaza, 2002). Koinjektion von  $\alpha$ -GalCer mit einer Malaria-Vakzine bestehend aus bestrahlten, attenuierten Sporozoiten bzw. einem rekombinant hergestellten Virus, der Malaria-Antigen exprimiert, schützte die Mäuse bei Exposition mit einer infektiösen Menge an Sporozoiten (*Challenge*) vor einer Infektion. In der Kontrollgruppe (Vakzine w/o  $\alpha$ -GalCer) wurde nach dem Challenge dagegen eine hohe Parasitenlast in der Leber über real-time PCR und Plasmodien-RNA-Kopien nachgewiesen. Die Antikörper-Titer nach der Vakzinierung waren bei allen Gruppen gleichermaßen erhöht, das bedeutet,  $\alpha$ -GalCer hatte keinen Einfluss auf die humorale Immunität. Demgegenüber war besonders die Anzahl der Malaria-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen, aber auch der spezifischen  $CD4^+$  T-Zellen in den  $\alpha$ -GalCer-behandelten Mäusen gegenüber den Kontrollmäusen deutlich erhöht (7-fach bzw. 5-fach). Diese beobachteten Effekte konnten in anschließenden Vakzinierungsstudien in  $CD1d$ -, NKT-Zell- und IFN- $\gamma$ -Rezeptor-defizienten Mäusen nicht reproduziert werden. Demnach basiert der Adjuvans-Effekt von  $\alpha$ -GalCer auf einer Aktivierung von  $V\alpha 14^+$  NKT-Zellen und deren IFN- $\gamma$ -Produktion.

Aus der Studie von Gonzalez-Aseguinolaza geht hervor, dass NKT-Zellen durch sekundäre Aktivierung von T-Zellen - via IFN- $\gamma$  - die adaptive zelluläre Immunität verstärken. Es ist

beschrieben, dass NKT-Zellen nach der Erkennung von  $\alpha$ -GalCer CD40-Ligand (CD40L) hochregulieren und über CD40/CD40L-Interaktion in direkte Wechselwirkung mit DC treten (Kitamura, 1999; Tomura, 1999). Damit verstärken NKT-Zellen die Aktivierung von Ag-beladenen DC sowie deren Fähigkeit zum Priming naiver T-Zellen. Wahrscheinlich trägt diese Verstärkung der DC-Funktion durch NKT-Zellen zu den potenten Adjuvanseigenschaften von  $\alpha$ -GalCer bei.

Da  $\alpha$ -GalCer sowohl im murinen als auch im humanen Immunsystem spezifisch von NKT-Zellen erkannt wird, erhofft man, dass die ersten in murinen Studien beobachteten medizinischen Erfolge mit  $\alpha$ -GalCer im humanen System reproduzierbar sind. Langfristiges Ziel könnte der gezielte Einsatz von  $\alpha$ -GalCer oder dessen Analoga in der Immuntherapie sein, um durch Aktivierung von NKT-Zellen eine zelluläre Immunantwort zu induzieren.

## 1.8 CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN)

### 1.8.1 Entdeckung der immunstimulatorischen Aktivität von bakterieller DNA

Der geschichtliche Hintergrund von CpG-Oligonukleotiden (CpG-ODN) geht bis in das 19. Jahrhundert zurück. Im Jahre 1893 berichtete der New Yorker Chirurg William Coley, dass bakterielle Lysate (Streptokokken-Lysate, später „*Coley's toxine*“ genannt) - intratumoral injiziert - die Rückbildung von Tumoren bei Sarkom-Patienten induzieren (Coley, 1991). Die Bedeutung von Coleys historischer Entdeckung, dass durch Imitation einer bakteriellen Infektion eine spezifische antitumorale Immunantwort verstärkt wird, erkannte man erst 100 Jahre später, als der Mechanismus der antitumoralen Wirkung bakterieller Lysate charakterisiert wurde.

Im Jahre 1984 entdeckte die japanische Arbeitsgruppe um Tokunaga, dass bakterielle DNA innerhalb bakterieller Lysate die höchste antitumorale Aktivität aufweist (Tokunaga, 1984). Im Gegensatz zu bakterieller DNA hat die DNA von Wirbeltieren keine immunmodulatorischen Eigenschaften (Yamamoto, 1992). Die immunstimulatorische Wirkung bakterieller DNA konnte wenig später auf Palindrome oder spiegelsymmetrische Nukleotidsequenzen mit einem zentralen Cytosin-Guanosin (CG)-Dinukleotid zurückgeführt und mittels einzelsträngiger, synthetischer Oligonukleotide (ODN) imitiert werden (Yamamoto, 1994).

Die genauen strukturellen Voraussetzungen für ein optimal immunstimulatorisches ODN formulierte schließlich Arthur Krieg (Krieg, 1995): Immunstimulatorisch wirksame ODN besitzen ein zentrales unmethyliertes Cytosin-Guanosin (CG)-Dinukleotid, das in einem bestimmten Basenkontext eingebettet ist (sog. "*CpG-Motiv*"). Inversion der Basen innerhalb des CG-Motivs zu GC, Methylierung des Cytosins oder Veränderung der das CpG-Motiv flankierenden Basen heben

den immunstimulatorischen Effekt auf. CpG-Motive (Cytosin-Guanosin-Dinukleotide mit Phosphatbindung) kommen in bakterieller DNA in der statistisch erwarteten Häufigkeit von 1:16 (1 von 16 Dinukleotiden) vor, sind in der DNA von Wirbeltieren dagegen unterrepräsentiert (1 von 60 Dinukleotiden). In Vertebraten-DNA liegen zudem ca. 80% der vorhandenen CpG-Motive in methylierter und damit immunologisch inaktiver Form vor. Offensichtlich ist die Erkennung von CpG-Motiven Teil eines konservierten Abwehrmechanismus des Vertebraten-Immunsystems, um sich vor dem Eindringen mikrobieller Pathogene zu schützen.

### 1.8.2 Stimulation des Immunsystems durch CpG-DNA

CpG-haltige DNA wird von Zellen des angeborenen Immunsystems als molekulares Muster für die Anwesenheit eines intrazellulären Erregers erkannt und löst als Gefahrensignal eine Immunreaktion aus, die geeignet ist, eine mikrobielle Infektion zu bekämpfen. Synthetische Oligonukleotide, die CpG-Motive enthalten (CpG-ODN), imitieren bakterielle DNA und können eine Immunreaktion *in vitro* und *in vivo* verstärken.

#### *Primäre CpG-Zielzellen: B-Zellen und plasmazytoide dendritische Zellen (PDC)*

CpG-ODN werden von Immunzellen durch den Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) erkannt (Hemmi, 2000). Im humanen Immunsystem exprimieren nur B-Zellen und plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) TLR9 und sind dadurch als einzige Immunzellen direkt sensitiv für CpG-Stimulation (Hornung, 2002). Die Stimulation mit CpG-DNA lässt sich in zwei Phasen einteilen: In der ersten, frühen Phase bewirkt die CpG-Stimulation rasch die Aktivierung der B-Zelle und PDC über TLR9. Als Konsequenz werden in der B-Zelle und in der PDC erhöhte Apoptoseresistenz, Expression kostimulatorischer Moleküle (CD80, CD86, CD40) und des Chemokinrezeptors CCR7, der für die Wanderung in die T-Zell-Zone der Lymphknoten verantwortlich ist, induziert. Außerdem wird die Produktion von Th1-Zytokinen und Chemokinen, wie MIP-1 (*macrophage inflammatory protein-1*) und IP-10 (*IFN-inducible protein-10*), bewirkt (Krieg, 2002). PDC sezernieren hohe Mengen an Typ-I-Interferon (Typ-I-IFN = IFN- $\alpha/\beta$ ) und reifen zu potenten Antigen-präsentierenden Zellen heran (Krug, 2001a). Die durch CpG-Stimulation induzierten Zytokine und Chemokine bewirken eine Reihe weiterer sekundärer Effekte, z.B. die Aktivierung von myeloiden DC, Monozyten und NK-Zellen und die verstärkte Expression von Fc-Rezeptoren auf Effektorzellen, woraus eine erhöhte Antikörper-abhängige Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) resultiert (Krieg, 2002). Die Aktivierung der angeborenen Immunität und die Ausreifung der dendritischen Zellen durch CpG-Stimulation in der ersten Phase bewirken in der zweiten Phase eine Verstärkung der adaptiven Immunität: Durch CpG-Stimulation findet eine erhöhte Antigen-Präsentation gegenüber T-Zellen in einem Th1-Zytokinmilieu statt, so dass die T-

Zelldifferenzierung in Richtung Th1 gefördert wird; zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen können durch CpG-Kostimulation ohne T-Zell-Hilfe geprimt werden (Wild, 1999; Sparwasser, 2000). B-Zellen reagieren auf CpG-Kostimulation bei gleichzeitigem Antigenkontakt mit einer verstärkten Antigen-spezifischen Antikörper-Produktion (Krieg, 1995). Demnach aktiviert CpG-Stimulation in zwei Phasen die unspezifische und die spezifische zelluläre und humorale Immunität.

Frühere Arbeiten proklamierten, dass auch humane Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen sensitiv für CpG-Stimulation sind. Experimente mit hoch aufgereinigten Zellpopulationen haben jedoch gezeigt, dass nur B-Zellen und PDC, nicht aber Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen im humanen System direkt auf CpG-DNA reagieren (Hornung, 2002).

### 1.8.3 Einteilung synthetischer CpG-Oligonukleotide in CpG-A, -B und -C

Bestimmte strukturelle Eigenschaften synthetischer CpG-Oligonukleotide sind dafür verantwortlich, dass CpG-ODN präferentiell B-Zellen oder PDC oder beide Zelltypen gleichermaßen aktivieren. Die direkte Stimulation von B-Lymphozyten und PDC durch CpG-DNA bewirkt eine indirekte Aktivierung anderer Immunzellen. Die distinkten CpG-ODN-Typen unterscheiden sich auch hinsichtlich der sekundären Aktivierung anderer Immunzellen. Basierend auf solchen strukturellen und funktionellen Eigenschaften werden CpG-ODN in verschiedene Gruppen eingeteilt. Bisher sind drei verschiedene CpG-Typen bekannt: Typ A, -B und -C (Krug, 2001a; Hartmann, 2003). Im folgenden sollen insbesondere die in dieser Arbeit verwendeten CpG-Typen A und -B kurz vorgestellt werden.

#### *CpG-A*

CpG-A (Prototyp ODN 2216) induziert sehr hohe, z.T. maximale Mengen an Typ-I-IFN (IFN- $\alpha/\beta$ ) in PDC (bis zu 5 pg IFN- $\alpha$  pro PDC nach ODN 2216-Stimulation) (Krug, 2001a). Eine vergleichbar hohe IFN- $\alpha$ -Produktion in PDC wird durch Stimulation mit einem Virus induziert. Folglich imitiert CpG-A für die PDC offenbar ein molekulares Muster für eine virale Infektion. CpG-A zeigt jedoch keine oder nur eine geringe Wirkung auf isolierte B-Zellen. Die Struktur von CpG-A ist durch ein chimäres Rückgrat gekennzeichnet: Die 5' und 3' Enden sind zur erhöhten Stabilität gegen Nukleasen phosphothioat-modifiziert, während die mittlere Region aus unmodifizierten Phosphodiestern besteht. (Unmodifizierte Phosphodiester-Oligonukleotide werden *in vivo* durch körpereigene Nukleasen sehr rasch abgebaut. Durch chemische Modifikation des Phosphodiester-Rückgrats, die sogenannte Phosphothioat-Modifikation, erreicht man eine erhöhte Stabilität des ODN gegenüber Nukleasen. In der Phosphothioat-Modifikation ist ein nicht an der Bindung beteiligtes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom ersetzt. Die *in vivo*-Halbwertszeit von Phosphothioat-ODN ist dadurch stark verlängert.) Weitere strukturelle

Besonderheiten für CpG-A sind: 1) Poly-G-Motive an beiden Enden; 2) zentrale Palindrom-Sequenz; 3) CG-Dinukleotide innerhalb des Palindroms (ODN-Sequenz, s. Material und Methoden).

CpG-A bewirkt über die Ausschüttung hoher Mengen an IFN- $\alpha/\beta$  durch die PDC eine Antigen-unabhängige Aktivierung von CD8<sup>+</sup> Memory-T-Zellen (Sprenth, 2000; Nguyen, 2002) und induziert eine Th1-Differenzierung von T-Zellen. Gleichzeitig verstärkt das nach CpG-A-Stimulation freigesetzte Typ-I-IFN die lytische Aktivität und IFN- $\gamma$ -Produktion von NK-Zellen sowie  $\gamma/\delta$  T-Zellen (Rothenfusser, 2001). IFN- $\alpha$  bewirkt außerdem die Reifedifferenzierung von Monozyten in Richtung DC (Krug, 2003a) (Abb. 2).

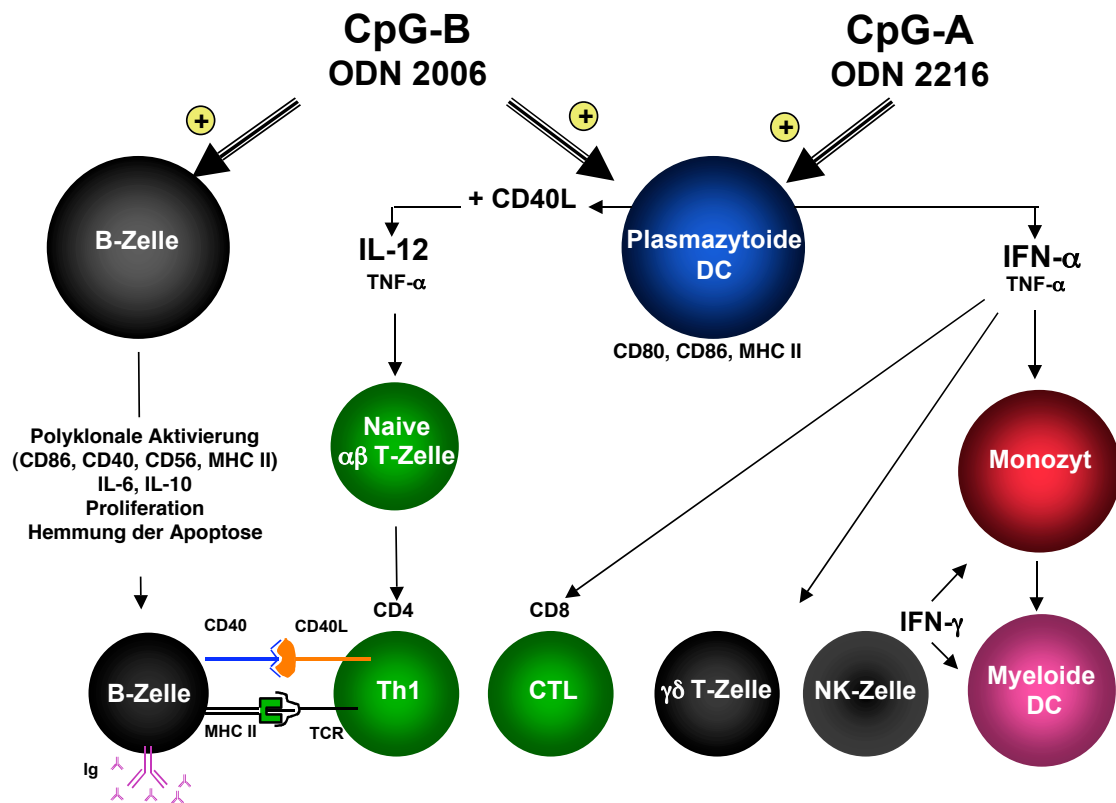
### *CpG-B*

CpG-B (Prototyp ODN 2006) aktiviert in erster Linie B-Zellen. Das Rückgrat dieser ODN-Gruppe ist vollständig phosphothioat-modifiziert, wodurch sie eine erhöhte Nukleaseresistenz besitzt. Stimulation mit CpG-B bewirkt eine vermehrte Oberflächenexpression Antigen-präsentierender und kostimulatorischer Moleküle auf B-Zellen (MHC-I, MHC-II bzw. CD80, CD86, CD40), die eine verbesserte Funktion der B-Zelle als APC innerhalb des Immunsystems vermuten lassen (Krieg, 1995; Hartmann, 2000). CpG-B-Stimulation steigert in B-Zellen die Sensitivität des Antigen-Rezeptors gegenüber einem spezifischen Antigen. Dadurch wird die Synthese von Immunglobulinen bei Antigenkontakt verstärkt. Daneben werden B-Zellen durch CpG-B zur Sekretion von Zytokinen (IL-6 und IL-10) angeregt.

CpG-B induziert auch die phänotypische und funktionelle Ausreifung der PDC. Reife PDC exprimieren Antigen-präsentierende und kostimulatorische Moleküle (MHC-II bzw. CD80, CD86, CD40) sowie den Reifemarker CD83 (Krug, 2001b). Dadurch steigt ihre Fähigkeit, allogene T-Zellen zu stimulieren. CpG-B-aktivierte PDC produzieren inflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6) und Chemokine (IL-8, IP-10) (Bauer, 2001; Krug, 2001a). Nach Ausreifung exprimieren PDC den Chemokin-Rezeptor CCR7 (Cella, 1999). Im Gegensatz zu CpG-A induziert CpG-B nur eine sehr schwache IFN- $\alpha$ -Produktion in PDC (Rothenfusser, 2002). Daher sind die IFN-abhängigen, sekundären Effekte von CpG-B auf T-Zellen, NK-Zellen,  $\gamma/\delta$  T-Zellen und Monozyten wesentlich geringer ausgeprägt als die von CpG-A. In Gegenwart von CD40L bewirkt CpG-B die Ausschüttung von bioaktivem IL12p70 durch die PDC, wodurch das Priming naiver  $\alpha/\beta$  T-Zellen zu Th1-Helferzellen verstärkt wird (Krug, 2001b). Direkter Zellkontakt zwischen CpG-aktivierter B-Zelle und Th1-Helferzelle verstärkt die Produktion Antigen-spezifischer Immunglobuline durch die B-Zelle (Abb. 2).

CpG-C

Der erst vor kurzem identifizierte ODN-Typ CpG-C vereint strukturelle und funktionelle Eigenschaften von CpG-A und -B (Hartmann, 2003). Das CpG-C ODN M362 enthält Sequenzmotive von CpG-B und das für CpG-A charakteristische Palindrom; es besitzt jedoch keine Poly-G-Motive, die für die Aktivität von CpG-A mitverantwortlich sind. Dennoch induziert CpG-C hohe Mengen an IFN- $\alpha$  in PDC, gleichzeitig bewirkt es auch eine starke B-Zellaktivierung. Aufgrund der hohen Aktivität in beiden CpG-Zielzellen könnte man verbesserte immunmodulatorische Fähigkeiten von CpG-C im Vergleich zu CpG-A und -B vermuten. Die bisherigen Daten bzgl. CpG-C beschränken sich jedoch auf *in vitro*-Experimente.



**Abb. 2: Immuneffekte von CpG-ODN im humanen Immunsystem (nach (Rothenfusser, 2003)).** Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) und B-Zellen werden direkt durch CpG-ODN aktiviert. Andere Immunzellen, wie Monozyten, myeloide dendritische Zellen (MDC), T-Zellen und NK-Zellen werden sekundär, v.a. durch die von PDC gebildeten Zytokine stimuliert. CpG-A (Prototyp ODN 2216) induziert die Produktion hoher Mengen an IFN- $\alpha$  in PDC. IFN- $\alpha$  von PDC aktiviert die Produktion von IFN- $\gamma$  in NK-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen. IFN- $\gamma$  zusammen mit dem von PDC-gebildeten IFN- $\alpha$  aktivieren Monozyten und MDC. IFN- $\alpha$  von PDC verstärkt auch die Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen (CTL). CpG-B (Prototyp ODN 2006) und CD40L stimulieren synergistisch die Produktion von IL-12 in PDC, wodurch das Primieren naiver  $\alpha\beta$  T-Zellen und ihre Differenzierung in Richtung Th1 verstärkt werden. Durch direkte B-Zell-Aktivierung und vermehrte Bildung von Th1-Zellen verstärkt CpG-B die spezifische humorale und zelluläre Immunantwort.

### *Erkennung von CpG-DNA durch Toll-like Rezeptor 9 (TLR9)*

Trotz umfangreicher Daten zur immunologischen Wirkung von CpG-DNA war der genaue intrazelluläre Erkennungsmechanismus von CpG-Motiven bis vor kurzem unklar. Erst im Jahr 2000 entdeckte die japanische Arbeitsgruppe um Akira, dass ein bestimmter Toll-like-Rezeptor, TLR9, für die Erkennung von CpG-haltiger DNA im murinen System verantwortlich ist (Hemmi, 2000). Dies konnte wenig später auch für das humane System nachgewiesen werden (Bauer, 2001). Toll-like Rezeptoren sind sogenannte "*Pattern Recognition Rezeptoren*" (PRR) des angeborenen Immunsystems, mit deren Hilfe bestimmte konservierte, Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen als Gefahrensignal im Vertebraten erkannt werden (s. 1.3). Exprimiert eine Zelle TLR9, ist sie sensitiv für CpG-Stimulation (Hemmi, 2000; Bauer, 2001). Im humanen Immunsystem wurde TLR9 nur auf B-Zellen und PDC nachgewiesen (Hornung, 2002). In Übereinstimmung mit ihrer fehlenden CpG-Sensitivität exprimieren humane Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen sowie MDC und aus Monozyten-generierte DC (mono-DC) kein TLR9 (Hornung, 2002).

#### 1.8.4 Immuntherapeutische Anwendung von CpG-ODN

Therapeutische Strategien mit CpG-ODN leiten sich aus ihrer oben beschriebenen, charakteristischen Wirkungsweise ab. Die durch CpG-Stimulation bewirkte Aktivierung der angeborenen Immunität und die darauf folgende Verstärkung einer Th1-gerichteten spezifischen Immunantwort lassen sich prophylaktisch in der Anwendung von CpG-ODN als Adjuvans bei Vakzinierungen sowie therapeutisch in der Immuntherapie von Infektionen, Tumoren und Allergien zu Nutze machen. An dieser Stelle soll lediglich ein kurzer Überblick über die Einsatzmöglichkeiten von CpG-ODN gegeben werden.

#### *CpG als Adjuvans*

In Impfstudien mit Mäusen wurde nachgewiesen, dass CpG-ODN optimale Adjuvanseigenschaften besitzen. CpG-ODN steigerten in Mäusen die Antigen-spezifische humorale und zelluläre Immunantwort weit effektiver als das Freund'sche Adjuvans ("*complete Freund's adjuvant*", CFA) und das humane Standard-Adjuvans Alum (Chu, 1997; Weiner, 1997; Davis, 1998; Moldoveanu, 1998). Während nach Alum-Gabe eine Th2-gerichtete humorale Immunantwort ohne die Bildung von CTL beobachtet wurde, bahnten CpG-ODN - analog zu CFA - eine Th1-gerichtete Immunantwort und verstärkten die Entwicklung spezifischer CTL (Davis, 1998). Dabei wiesen CpG-ODN trotz hoher immunstimulatorischer Aktivität eine wesentlich geringere Toxizität als CFA auf (Weiner, 1997). Im humanen Immunsystem basiert die gute Verträglichkeit von CpG-ODN im Vergleich zu anderen Adjuvantien, wie CFA, auf der selektiven Aktivierung bestimmter Zielzellen (B-Zellen und PDC) und der fehlenden direkten Aktivierung myeloider Zellen. Eine

anhaltende Aktivierung von Makrophagen und anderen Vertretern der myeloiden Zellreihe (wie Monozyten, myeloide DC) induziert die Produktion hoher Mengen an inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (z.B. TNF- $\alpha$  und IL-12), die gewebstoxische Nebenwirkungen verursachen. Zusätzlich führen schlecht abbaubare Substanzen, wie das in CFA-Emulsion enthaltene Mineralöl, zu einer anhaltenden Aktivierung von Makrophagen und anderen phagozytose-aktiven APC, die Adjuvantien internalisieren (Hamilton, 2003). Wegen seiner unerwünschten Nebeneffekte ist heutzutage die Anwendung von CFA auch in Tierversuchen problematisch. So können einige Tage nach subkutaner Injektion von CFA sehr schmerzhaft, langanhaltende Entzündungsreaktionen bis hin zu Ulzerationen um die Einstichstelle bei den Versuchstieren auftreten (Billiau, 2001).

Vakzinierungsstudien in Primaten haben bestätigt, dass ODN 2006 (CpG-B) die spezifische humorale Immunantwort auf eine Vakzine maßgeblich verstärkt (Jones, 1999; Davis, 2000; Hartmann, 2000). Bisher gibt es erst wenige Daten darüber, ob CpG-ODN wie in der Maus auch im Primaten eine Antigen-spezifische T-Zellantwort verstärken. Die erste und bisher einzige Primaten-Studie zu dieser Fragestellung wurde kürzlich von der Arbeitsgruppe um Klinman veröffentlicht (Verthelyi, 2002). Nach Vakzinierung von Rhesusaffen mit einer Leishmania-Vakzine bestehend aus hitzeinaktivierten Leishmanien (HKLV) und Alum plus CpG-ODN (HKLV+Alum+CpG-ODN) wurden mehr spezifische IFN- $\gamma$ -produzierende T-Zellen gebildet als in der Kontrollgruppe ohne CpG-ODN (HKLV+Alum w/o CpG-ODN). Diese Daten weisen daraufhin, dass CpG-ODN auch im Primaten eine Antigen-spezifische T-Zellantwort verstärken. Damit eröffnen sich vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten für CpG-ODN als Immun-Adjuvans bei Vakzinen, die einen T-Zell-vermittelten Schutz gegen intrazelluläre Erreger und Tumore bewirken sollen.

### *CpG-Therapie bei Infektionen*

In Mausmodellen erzielte CpG-DNA durch Verstärkung einer Th1-gerichteten Immunantwort einen *präventiven* Schutz gegen intrazelluläre Bakterien, wie Listerien, Leishmanien und Malaria (Krieg, 1998; Zimmermann, 1998; Elkins, 1999; Walker, 1999; Gramzinski, 2001; Krieg, 2002), sowie *therapeutische* Erfolge bei Leishmanien (Zimmermann, 1998; Walker, 1999). Dabei führte CpG-Behandlung zu einer spezifischen Gedächtnisantwort, da Mäuse bei einem Rechallenge vor den Erregern geschützt waren.

### *CpG-Therapie bei Tumoren*

Durch die CpG-abhängige Aktivierung unspezifischer Effektorzellen (NK-Zellen, Makrophagen) wird die Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) verstärkt. Vermutlich basierend auf einer Erhöhung der ADCC steigern CpG-ODN die anti-tumorale Aktivität von onkologisch eingesetzten monoklonalen Antikörpern (z.B. *Rituximab* =



Anti-CD20-mAb). Dies führte in einem murinen Lymphom-Modell zur Reduktion des Tumorwachstums (Wooldridge, 1997).

In der Maus erzielten CpG-ODN alleine nach peritumorale Gabe bzw. in Kombination mit einer Tumorstoffimpfung - bestehend aus Tumor-Antigen-beladenen DC - effiziente anti-tumorale Immunantworten (Weiner, 1997; Heckelsmiller, 2002a; Heckelsmiller, 2002b). CpG-Behandlung führte in diesen Modellen zur Regression solider Tumore, Bildung von tumor-spezifischen CTL und Entwicklung einer spezifischen Memory-T-Zell-Antwort. Ausgehend von diesen tierexperimentellen Daten erhofft man sich auch beim Menschen therapeutische Fortschritte mit CpG-DNA in der Immuntherapie von Tumoren. Erste klinische Studien mit CpG-ODN bei Tumoren sind bereits angelaufen.

### *CpG-Therapie bei Allergien*

Allergische Erkrankungen beruhen meistens auf einer Th2-gerichteten Überreaktion des Immunsystems mit verstärkter Bildung von IL-4 und IL-5 sowie IgE-Antikörpern. CpG-ODN induzieren eine Th1-gerichtete Immunantwort, charakterisiert durch die Ausschüttung von IL-12, IFN- $\gamma$  und IgG<sub>2a</sub>. Eine CpG-Therapie bei Allergien kann eine Immunantwort vom Th2-Typ antagonisieren (Parronchi, 1999). Erste Studien im Tiermodell bei Asthma bronchiale zeigten eine deutliche Abschwächung der allergischen Reaktion durch CpG-ODN (Kline, 1998).

### *Antisense-ODN mit CpG-Motiven*

Antisense-ODN bewirken durch komplementäre Bindung an ein Targetgen oder -protein spezifisch dessen Ausschaltung. Bisher gibt es in Deutschland ein Antisense-Medikament, das zur Behandlung der Cytomegalie-Virus(CMV)-Retinitis bei Patienten mit AIDS indiziert ist (Fomivirsen, Vitravene®). Neben seiner Target-spezifischen Nukleotidsequenz enthält Fomivirsen immunstimulatorische CpG-Dinukleotide, die eine verstärkte Aktivierung des Immunsystems und somit eine Effizienzsteigerung des Medikamentes vermuten lassen.

## 1.8.5 Spezies-spezifische Unterschiede in der Erkennung von CpG-ODN

Murines und humanes System weisen hinsichtlich der Erkennung von CpG-ODN entscheidende Unterschiede auf: i) CpG-ODN mit optimal immunstimulatorischen Eigenschaften in der Maus wirken nicht vergleichbar aktivierend auf das humane Immunsystem und umgekehrt. Folglich mussten für beide Spezies optimal immunstimulierende CpG-ODN entwickelt werden; ii) Die CpG-Zielzellen im murinen System sind zum Teil andere als beim Menschen. Monozyten und myeloide DC exprimieren in der Maus TLR9 und reagieren daher direkt auf CpG-ODN, unter

anderem mit der Produktion von IL-12; im humanen System können diese Zellen dagegen aufgrund fehlender TLR9-Expression nicht direkt auf CpG-DNA reagieren.

Die Spezies-spezifischen Unterschiede in den Immuneffekten von CpG-DNA schränken die Übertragbarkeit der Daten von Mausmodellen auf das humane System stark ein und unterstreichen die Notwendigkeit, CpG-basierte Therapie-Strategien in einem Primatenmodell zu testen.

### **1.9 Das *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) im Rhesusaffen als Infektionsmodell für das *Human Immunodeficiency Virus* (HIV)**

Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) sind phylogenetisch eng mit dem Menschen verwandt. Als nicht-humane Primaten mit einem Körpergewicht von 5-8 kg eignen sie sich gut als Tiermodell für präklinische Studien. Die Durchführung von Studien an nicht-humanen Primaten ist insbesondere dann sehr wichtig, wenn (i) eine Substanz aufgrund speziesspezifischer Unterschiede in der Wirkung nicht in einfacheren Tiermodellen (Maus, Ratte) getestet werden kann oder (ii) Infektionskrankheiten innerhalb der Primatenspezies, wie das *Human immunodeficiency virus* (HIV), untersucht werden sollen.

Im Jahr 1983 wurden im *New England Regional Primate Research Center* (Harvard Medical School, Boston, USA) in einer Makakenpopulation ungewöhnliche Lymphadenopathien und Immunschwäche-assoziierte Krankheiten beobachtet (Hunt, 1983; Letvin, 1983a; Letvin, 1983b). Wenig später identifizierte und isolierte man einen neuen T-Zell-tropischen Retrovirus, der für die Erkrankung der Tiere verantwortlich war (Daniel, 1984). Dieser wurde als *Simian immunodeficiency virus* (SIV, *simian* = engl. affenartig) benannt, da er eine hohe genetische Homologie mit dem *Human immunodeficiency virus* aufweist und seine Interaktionen mit Immunzellen denen von HIV sehr ähnlich sind (Kanki, 1985; Hirsch, 1986; Chakrabarti, 1987; Franchini, 1987; Hirsch, 1987). In Zellkultur infiziert SIV insbesondere CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Kannagi, 1985). Wie HIV benutzt SIV den CD4 Rezeptor und einen weiteren Korezeptor aus der Familie der Chemokinrezeptoren (z.B. CCR5) zur Infektion einer Wirtszelle (Whetter, 1999). Von HIV kennt man mindestens zwei verschiedene Virusstämme: HIV-1 und HIV-2. HIV-2 ist in Westafrika und Indien verbreitet; der aggressivere Stamm HIV-1 ist weltweit stärker verbreitet und heute die häufigste Ursache für AIDS. Bei SIV unterscheidet man inzwischen vier verschiedene Virus-Typen: (i) Macaque/Mangabey (SIVmac/SIVsm); (ii) African green monkey (SIVagm); (iii) Mandrill (SIVmnd) und (iv) Chimpanzee (SIVcpz). Zwei dieser SIV-Untergruppen sind sehr eng mit den Auslösern des humanen AIDS verwandt: SIVcpz mit HIV-1 und SIVmac/SIVsm mit HIV-2 (Johnson, 1992). Die experimentelle Infektion eines Rhesusaffen mit SIV resultiert in ein Krankheitsbild, das auffällige Ähnlichkeit mit dem humanen *Acquired immunodeficiency syndrome*

(AIDS) hat. Bis heute ist SIV im Rhesusaffen das beste HIV-Modell, um die Pathogenese von AIDS in einem Primaten zu untersuchen (Johnson, 1992).

Zur experimentellen Infektion mit SIV werden Rhesusaffen mit infektiösen Gewebekultur-Überständen oder Körpermaterial eines SIV-infizierten Rhesusaffen (Blut, Plasma, Lymphozyten) intravenös oder mukosal beimpft. Die SIV-Infektion resultiert in einer persistierenden Infektion, Immundefizienz, opportunistischen Erkrankungen und schließlich dem Tod des Tieres. Immunologische und virologische Parameter im Verlauf der Krankheit (s. Abfall der T-Zellen, Anzahl der Virus-Kopien im Blut) können leicht quantifiziert werden. Der Virus proliferiert rasch, so dass SIV kurz nach der Infektion bereits im Plasma der Tiere nachweisbar ist. In den ersten Wochen nach Infektion beobachtet man bereits einen Abfall der gesamten zirkulierenden Leukozyten und speziell der  $CD4^+$  T-Zellen. Zu den frühen klinischen Symptomen zählen bei den meisten Tieren periphere Lymphadenopathie und erythematöse, maculopapulöse Hautrötung. Nach dieser ersten Krankheitsphase sind drei verschiedene klinische Verläufe bekannt: Ein Drittel der Tiere entwickelt eine persistierende Virämie ohne die Bildung spezifischer Antikörper. Diese Affen sterben sehr schnell, bereits in den ersten Monaten nach Infektion. Ein weiteres Drittel bis die Hälfte der Tiere entwickelt neben einer persistierenden Virämie eine starke SIV-spezifische Antikörper-Antwort. Diese Tiere überleben ein bis drei Jahre, wobei der klinische Verlauf durch progressiven Gewichtsverlust, Abfall der SIV-spezifischen Antikörpertiter sowie der zirkulierenden  $CD4^+$  T-Zellen gekennzeichnet ist. Zu den terminalen Krankheitssymptomen zählt eine schwere Enteropathie (Malabsorption, Diarrhoe, Gewichtsverlust). Ein kleinerer Teil der infizierten Affen bleibt - bei persistierender Infektion - über Jahre hinweg klinisch gesund. In diesen Affen beobachtet man eine besonders effektive und anhaltende Antikörper-Antwort gegen SIV. Die Faktoren, die dafür verantwortlich sind, dass ein Tier den einen oder anderen Krankheitsverlauf entwickelt, sind unklar. Man vermutet, dass bereits sehr früh nach einer Infektion das Schicksal des Tieres determiniert wird (Johnson, 1992).

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### *Geräte*

FACS-Calibur:	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg)
ELISA-Reader:	Fa. Dynatech (Guernsey, Channel Islands, GB)
Zentrifuge Sepatech Omnifuge:	Fa. Heraeus (München)
Zentrifuge 5417R:	Fa. Eppendorf (Hamburg)
Brutschrank, Modell 1384:	Fa. Heraeus (München)
Thermocycler, Modell T3:	Fa. Biometra (Göttingen)
Thermocycler RoboCycler Gradient 40:	Fa. Stratagene (Heidelberg)
Mikroskop:	Fa. Zeiss (Jena)
Vortexer:	Fa. Janke & Kunkel (Staufen)
pH-Meter:	Fa. WTW (Weilheim)
Eismaschine:	Fa. Ziegra (Isernhagen)

#### *Chemikalien*

PharM Lyse-Reagenz:	Fa. BD PharMingen (Heidelberg)
EDTA (kristallin):	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Heparin-Natrium:	Fa. Ratiopharm (Ulm)
0,9%ige Kochsalzlösung (NaCl):	Fa. Baxter (Unterschleißheim)
FACS-Flow:	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg)
FACS-Clean/FACS-Rinse:	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg)
Trypan-Blau:	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)

#### Reagenziensätze:

High-Pure-RNA-Isolation Kit:	Fa. Roche (Mannheim)
First-Strand-cDNA-Synthesis Kit:	Fa. Roche (Mannheim)
IFN-alpha ELISA:	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, NJ, USA); Fa. Bender Med Systems/Vertrieb: Biozol (Eching)
IL-4 ELISA Kit:	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, CA, USA)
IFN-gamma ELISA Kit:	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, CA, USA)
IL-6 ELISA:	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, CA, USA)
IP-10 ELISA:	Fa. R&D Systems (Wiesbaden)
Anti-FITC MicroBeads:	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
BDCA-4 Dendritic Cell Isolation Kit:	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

CD1c (BDCA-1) DC Isolation Kit: Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

Materialien für die Zellkultur:

RPMI-Medium	Fa. Biochrom (Berlin)
Fötale Kälberserum (FCS):	Fa. GibcoBRL (Paisley, Schottland)
Humanes Serum-Albumin:	Fa. Pharmacia & Upjohn (Erlangen)
Biocoll Separationsmedium (Ficoll):	Fa. Biochrom (Berlin)
Penicillin:	Fa. PAA (Linz, Österreich)
Streptomycin:	Fa. PAA (Linz, Österreich)
L-Glutamin:	Fa. PAA (Linz, Österreich)
PBS ( <i>Phosphate buffered saline</i> ):	Fa. PAA (Linz, Österreich).

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen), Falcon (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden) und Corning (Corning, NY, USA) bezogen.

Antigen und Zytokine:

$\alpha$ -Galaktosylceramid ( $\alpha$ -GalCer)	Fa. Kirin Brewery (Japan)
Interferon- $\alpha$ :	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, NJ, USA)
Interferon- $\beta$ :	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, NJ, USA)

Medium und Puffer:

"RPMI-Vollmedium":

RPMI-Medium  
10 vol% Fötale Kälberserum (FCS)  
100 IU/ml Penicillin  
100  $\mu$ g/ml Streptomycin  
2 mM Glutamin

"MACS-Puffer":

PBS  
0,5 vol% humanes Serum-Albumin  
2 mM EDTA  
pH=7,2-7,4

*Antikörper*

Folgende humane bzw. nicht-humane Primaten-Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

*(1) Antikörper gegen humane Oberflächenmoleküle und Zytokine*

Name	Spezifität	Klon	Isotyp	Fluoreszenz (bei FACS-Antikörpern)	Hersteller
Anti-V $\alpha$ 24	V $\alpha$ 24	C15	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	Immunotech
Anti-V $\beta$ 11-Biotin	V $\beta$ 11	C21	Maus IgG <sub>2a</sub>	-	Immunotech
Streptavidin-APC	Streptavidin	-	-	APC	BD PharMingen
Anti-CD1d	CD1d	CD1d42	Maus IgG <sub>1</sub>	PE	BD PharMingen
Anti-CD3	CD3	SK7	Maus IgG <sub>1</sub>	PerCP	BD PharMingen
Anti-CD11c	CD11c	S-HCL-3	Maus IgG <sub>2b</sub>	APC	BD PharMingen
Anti-CD14	CD14	M5E2	Maus IgG <sub>2a</sub>	FITC	BD PharMingen
Anti-CD19	CD19	HIB19	Maus IgG <sub>1</sub>	APC	BD PharMingen
Anti-CD40	CD40	5C3	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	BD PharMingen
Anti-CD69	CD69	FN50	Maus IgG <sub>1</sub>	PE	BD PharMingen
Anti-CD80	CD80	L307.4	Maus IgG <sub>1</sub>	PE	BD PharMingen
Anti-CD83	CD83	HB15e	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	BD PharMingen
Anti-CD86	CD86	2331	Maus IgG <sub>1</sub>	APC	BD PharMingen
Anti-HLA-DR	HLA-DR	L243	Maus IgG <sub>2a</sub>	PerCP	BD PharMingen
Lineage Cocktail 1 (lin 1)	CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56	SK7	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	BD PharMingen
Anti-IFN-alpha	IFN-alpha	Poly	Hase	-	PBL
Anti-IFN-beta	IFN-beta	Poly	Hase	-	PBL
Anti-IFN-alpha- Rezeptor (CD118)	IFN-alpha Rezeptor Chain 2	MMHAR- 2	Maus IgG <sub>2a</sub>	-	PBL
Anti-Interleukin 12	IL12 p40+p70	C8.6	Maus IgG <sub>1</sub>	-	BD PharMingen

*(2) Antikörper gegen Rhesusaffen-Oberflächenmoleküle*

Name	Spezifität	Klon	Isotyp	Fluoreszenz (bei FACS-Antikörpern)	Hersteller
Anti-CD3	Rhesus-CD3	SP34	Maus IgG <sub>3</sub>	FITC	BD PharMingen
Anti-CD4	Rhesus-CD4	SK3	Maus IgG <sub>1</sub>	APC	BD PharMingen
Anti-CD8	Rhesus-CD8	SK1	Maus IgG <sub>1</sub>	PerCP	BD PharMingen
Anti-CD14	Rhesus-CD14	M5E2	Maus IgG <sub>2a</sub>	FITC	BD PharMingen
Anti-CD16	Rhesus-CD16	3G8	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	BD PharMingen
Anti-CD20	Rhesus-CD20	2H7	Maus IgG <sub>2b</sub>	FITC/ PE	BD PharMingen
Anti-CD40	Rhesus-CD40	5C3	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	BD PharMingen
Anti-CD80	Rhesus-CD80	L307.4	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	BD PharMingen
Anti-CD86	Rhesus-CD86	IT2.2	Maus IgG <sub>2b</sub>	APC	BD PharMingen
Anti-CD123	Rhesus-CD123	7G3	Maus IgG <sub>2a</sub>	PE	BD PharMingen
Anti-HLA-DR	Rhesus-HLA-DR	L243	Maus IgG <sub>2a</sub>	PerCP	BD PharMingen

*Oligonukleotide (ODN)*

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma *Coley Pharmaceutical Group* (Wellesley, MA, USA) bezogen und auf Endotoxin getestet (Endotoxin-Gehalt < 0,1EU/ml, LAL-Assay, Fa. BioWhittaker (Walkersville, MD, USA)). Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 6 µg/ml (bzw. wenn ausdrücklich darauf hingewiesen 3 µg/ml) eingesetzt. Folgende Oligonukleotide wurden in dieser Arbeit verwendet:

Name	Länge	Sequenz	Rückgrat	ODN-Typ
2006	24-mer	5`-tcg tcg ttt tgt cgt ttt gtc gtt-3`	S	CpG-B
2216	19-mer	5`-ggg gga cga tcg tcg ggg g-3`	SOS	CpG-A
2243	19-mer	5`-ggg gga gca tgc tgc ggg g-3`	SOS	GC-Kontroll-ODN zu ODN 2216

O = Phosphodiester, S = Phosphothioat

**2.2 Präparation, Isolation und Kultur von Zellen**

Alle Zellpräparationen, Isolationsschritte und Zellkultur-Experimente wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom (LaminAir HB 2448, Heraeus, München) durchgeführt.

*Isolation von humanen peripheren Blutlymphozyten*

Humane periphere Blutlymphozyten (später PBMC genannt, nach engl. *peripheral blood mononuclear cells*) wurden durch Dichtezentrifugation aus Buffy Coats (mit der freundlichen Unterstützung der Uniklinik Greifswald, Dr. Lubenow) isoliert. Als Buffy Coats werden die bei der Zentrifugation von Blutspenden entstehenden Leukozyten-Konzentrate bezeichnet, deren Anteil an Erythrozyten nur noch gering ist (=Abfallprodukte einer Blutspende). Die Leukozyten-Präparate wurden steril aus dem Buffy Coat-Beutel mit einer Perfusorspritze entnommen, im Verhältnis 1:2 mit isotoner Kochsalzlösung (0,9%ige NaCl-Lösung) verdünnt und in einem 50ml-Polypropylen-Röhrchen (*Blue Cap*) langsam über 15 ml körperwarmes Ficoll (=Biocoll) geschichtet, so dass zwei Phasen entstanden (untere Phase Ficoll, obere Phase Buffy Coat/NaCl-Mischung). Anschließend wurde 20 min bei 1000 g (Beschleunigung: 1, Bremsung: 1) zentrifugiert. Ficoll besitzt aufgrund seiner spezifischen Dichte von 1.077 g/ml die Eigenschaft, in einer Dichte-Zentrifugation mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) an der Phasengrenze zwischen Blutserum (obere Phase) und Ficoll (untere Phase) anzureichern. Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren wegen ihrer höheren Dichte in bzw. unter die Ficollschicht. Thrombozyten finden sich aufgrund ihrer geringeren Dichte in der Serumschicht oberhalb des Ficoll. Die Zellen an der Phasengrenze (Lymphozyten und Monozyten) wurden vorsichtig - in möglichst kleinem Volumen, um wenig Ficoll mit aufzunehmen - mit einer Pipette aspiriert.

Anschließend wurden die Zellen zweimal in 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen (Zentrifugation 10 min bei 300 g und 4 °C), bevor sie zur Lyse der verbliebenen Erythrozyten in 5 ml PharmLyse-Reagenz aufgenommen und 5 min inkubiert wurden. Nach einem erneuten Waschgang mit isotoner NaCl-Lösung wurde die Zellzahl bestimmt (s.u.).

#### *Isolation von peripheren Blutlymphozyten aus Rhesusaffen-Blut*

Zur Isolation von Rhesus-PBMC wurde 3-10 ml frisches Rhesusblut von gesunden Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) aus dem Deutschen Primatenzentrum (DPZ) in Göttingen verwendet (mit freundlicher Unterstützung durch die Arbeitsgruppe von Dr. Christiane Stahl-Henning, DPZ, Göttingen). Das Rhesusblut wurde entweder mit isotoner NaCl-Lösung auf 35 ml verdünnt und in 50ml-Blue Caps über 15 ml körperwarmes Ficoll geschichtet. Alternativ wurden 15ml-Blue Caps verwendet, in denen 10 ml NaCl-Rhesusblut-Mischung über 5 ml Ficoll pipettiert wurden. Die anschließende PBMC-Isolation erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll zur Isolation von humanen PBMC aus Buffy Coats.

#### *Bestimmung der Zellzahl und Vitalität*

Zur Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Tote Zellen färben sich durch Zugabe des Trypanblau-Farbstoffs (aufgrund der nicht mehr intakten Zellmembran) im Gegensatz zu lebenden Zellen blau an. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl der Probe nach geeigneter Verdünnung der Zellsuspension durch Zählen der nicht-gefärbten vitalen Zellen unter dem Lichtmikroskop ermittelt.

#### *Aufreinigung von Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)*

Bei der Isolation von Zellen nach dem *MACS*-Prinzip (*magnetic activated cell sorting*) werden Zellen mit speziellen Antikörpern markiert, die an magnetische Microbeads gekoppelt sind. Dazu werden die Zellen zunächst 15 Minuten lang in einem speziellen MACS-Puffer bei 4 °C mit den magnetisch markierten Antikörpern inkubiert, anschließend mit kaltem MACS-Puffer gewaschen und resuspendiert. Anschließend wird die markierte Zellsuspension auf eine magnetische Trennsäule (LS-Säule, Fa. Miltenyi) gegeben, die in einem Magnetfeld plziert ist. Alle mit Microbeads gekoppelten Zellen werden in der Matrix zurückgehalten. Alle unmarkierten Zellen werden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt. Anschließend wird die Trennsäule aus dem Magnetfeld herausgenommen und die markierte Zellpopulation aus der Säule eluiert. Um die Reinheit der isolierten Zellen zu erhöhen, kann die Selektionsprozedur nach einem Waschschrift ohne erneute Inkubation mit Antikörper mit einer kleineren Säule (MS-Säule, Fa. Miltenyi) wiederholt werden. Sowohl die markierte als auch die unmarkierte Zellfraktion lassen sich anschließend in Zellkultur-Experimenten einsetzen. Zur Aufreinigung von Zellpopulationen (s.



NKT-Zellen, B-Zellen, PDC, MDC) nach der MACS-Methode wurden in dieser Arbeit ausschließlich Reagenziensätze der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) nach dem entsprechenden Hersteller-Protokoll verwendet. - Zur Isolation von humanen NKT-Zellen wurden PBMC (bis zu  $8 \times 10^8$  in 300  $\mu$ l MACS-Puffer) zunächst mit anti-V $\alpha$ 24-FITC (20  $\mu$ l) für 10 Minuten bei 4 °C, anschließend mit magnetischen anti-FITC Microbeads markiert. Die Reinheit der nach dem MACS-Prinzip isolierten NKT-Zellen lag zwischen 70 und 96%. PDC und MDC wurden mit dem BDCA-4- bzw. BDCA-1-Isolationskit von Miltenyi isoliert, B-Zellen mit dem B-Zell-Isolationskit der Fa. Miltenyi. Die Reinheiten der verschiedenen Zellpopulation nach Aufreinigung betrugen 70-96% (PDC) und > 95% (MDC, B-Zellen). In einigen Experimenten wurden PDC- bzw. MDC-depletierte PBMC eingesetzt. Dazu wurden zunächst PDC bzw. MDC nach dem MACS-Prinzip durch magnetisch markierte Beads positiv selektioniert. Die Negativfraktion (= unmarkierte Zellfraktion) stellte die PDC- bzw. MDC-depletierten PBMC dar. In PDC-depletierten PBMC waren weniger als 0,1% PDC nachweisbar. Nach Stimulation mit CpG-A war die IFN- $\alpha$ -Produktion in PDC-depletierten PBMC stark reduziert, jedoch - wahrscheinlich durch einen sehr geringen Restanteil an PDC - immer noch messbar. In MDC-depletierten PBMC waren  $\leq 0,03\%$  MDC nachweisbar.

### *Zellkulturen*

Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank (Heraeus 1384, München) bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Anteil inkubiert. Als Kulturmedium wurde RPMI-Vollmedium verwendet.

### *Stimulation von humanen NKT-Zellen mit CpG-ODN und $\alpha$ -GalCer*

Isolierte NKT-Zellen (20 000-50 000 V $\alpha$ 24<sup>+</sup> Zellen/200  $\mu$ l) wurden mit autologen PBMC ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml = 400 000 PBMC/200  $\mu$ l) in 96 well-Rundboden-Platten  $\pm$  CpG-ODN (6  $\mu$ g/ml) zwei Tage lang in RPMI-Vollmedium kultiviert (Volumen/well: 200  $\mu$ l). Als antigener Stimulus wurde Endotoxin-getestetes  $\alpha$ -Galaktosylceramid ( $\alpha$ -GalCer) in einer Konzentration von 100 ng/ml dazu gegeben. Am Tag 2 wurden zellfreie Überstände abgenommen und für Zytokinbestimmungen (ELISA) verwendet. Die Zellen wurden geerntet und ihre Oberflächenantigen-Expression im Durchflusszytometer untersucht. In einigen Experimenten wurde rekombinantes IFN- $\alpha$  in einer Konzentration von 5000 U/ml zu den Kulturen gegeben bzw. durch Zugabe der folgenden Kombination blockierender Antikörper die Wirkung von Typ-I-IFN inhibiert: Anti-IFN- $\alpha$  (5000 neutralisierende U/mL), anti-IFN- $\beta$  (2000 neutralisierende U/ml) und anti-IFN- $\alpha/\beta$  Rezeptor (20  $\mu$ g/ml). Zur Blockade von IL-12 wurden anti-IL-12(p40+p70)-Antikörper in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml eingesetzt.

### *Stimulation von Rhesus-PBMC mit CpG-ODN*

Rhesus-PBMC ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden  $\pm$  CpG-ODN (3  $\mu$ g/ml) in RPMI-Vollmedium auf 96 well-Rundbodenplatten zwei Tage lang kultiviert (Volumen/well: 200  $\mu$ l). Am Tag 2 wurden zellfreie Überstände abgenommen und für Zytokinbestimmungen (ELISA) verwendet. Die Rhesus-Zellen wurden geerntet und ihre Oberflächenantigen-Expression im Durchflusszytometer untersucht.

### *Gewinnung von CpG-induzierten löslichen Faktoren (CpG CM)*

Zur Gewinnung humaner CpG-induzierter löslicher Faktoren (ODN 2216-*conditioned medium* = 2216 CM) wurden isolierte PDC (20 000-50 000 PDC/200  $\mu$ l) bzw. PBMC ( $3 \times 10^6$  Zellen/ml) mit ODN 2216 (3  $\mu$ g/ml) stimuliert und der zellfreie Kulturüberstand nach 48h bzw. 24h geerntet. Zur Gewinnung von Rhesus-CpG CM wurden Rhesus-PBMC ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) mit CpG-ODN (3  $\mu$ g/ml) für 48h stimuliert und der zellfreie Kulturüberstand geerntet. 2006 CM bzw. 2216 CM von verschiedenen Spendern wurden dabei jeweils gepoolt. In den Versuchen mit CpG CM wurde die Hälfte des Kulturmediums durch CpG CM ersetzt (=50vol% CpG CM).

### *Transwell-Experimente*

In einigen Experimenten wurde ein Transwell-Kokultursystem verwendet (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark), in dem die untere Zellkammer von der oberen Kammer durch eine 0,2 $\mu$ m-*Anapore*-Membran getrennt ist. Durch die 0,2 $\mu$ m-Membran ist ein Austausch löslicher Faktoren möglich, nicht jedoch direkter Zell-zu-Zell-Kontakt zwischen den Zellen der unteren und oberen Kammer. Angereicherte NKT-Zellen (20 000-50 000 V $\alpha$ 24<sup>+</sup> NKT-Zellen plus 400 000 PDC-depletierte PBMC/500  $\mu$ l) wurden in 500  $\mu$ l Kulturmedium in die untere Kammer des Transwells pipettiert, während isolierte PDC (ca. 30 000 PDC/500  $\mu$ l) ebenfalls in 500  $\mu$ l Medium in die obere Kammer gegeben wurden (Endvolumen/well: 1 ml). Anschließend wurden die Zellen mit CpG-ODN (6  $\mu$ g/ml) und  $\alpha$ -GalCer (100 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle wurden alle Zellen zusammen, ohne Membraneinsatz in demselben Volumen und mit denselben Stimuli inkubiert.

## **2.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

### *Allgemeines Funktionsprinzip*

Die Durchflusszytometrie mittels eines *fluorescence-activated cell sorters* (FACS) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand von Oberflächenantigenen zu unterscheiden und zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ein bestimmtes

Oberflächenantigen markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch einen Laserstrahl geführt.

Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile führen zu einer Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht, engl. *forward scatter*, FSC) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht, engl. *sideward scatter*, SSC) gesammelt und photometrisch detektiert wird. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) wird im wesentlichen durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC) durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Die gewünschte Zellpopulation wird anhand dieser Kriterien ausgewählt und weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht.

Der Laserstrahl regt das Chromophor des für die Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörpers zur Emission von Lichtquanten an, die durch eine Linse gesammelt werden. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen auf und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei der Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenz ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle.

Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überschneiden. Diese Überschneidung wird durch sog. *Kompensation* korrigiert. Hierzu werden bei jedem Versuch Kontrollproben, die jeweils nur einen bindenden Antikörper gekoppelt an ein Fluorochrom enthalten, verwendet. Als Negativkontrolle dienen an geeignete Isotypen-Antikörper gebundene Fluorochrome. Strahlt ein bestimmtes Fluorochrom in andere Kanäle hinein, kann dieser Anteil von dem jeweiligen Fluoreszenzsignal über einen elektronischen Mechanismus abgezogen werden (Kompensation).

### *FACS-Analyse*

Für Durchflusszytometer-Messungen wurden  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  Zellen in FACS-Röhrchen (in 40-200  $\mu$ l PBS oder Vollmedium) mit FITC-(Fluorescein-Isocyanat-), PE-(Phycoerythrin-), PerCP-(Peridin-Chlorophyll-Protein-) oder APC-(Allophycocyanin-) gekoppelten Antikörpern 15-30 Minuten lang, bei 4 °C, im Dunkeln inkubiert. Zur Anfärbung von V $\beta$ 11 auf NKT-Zellen wurde zuerst mit V $\beta$ 11-Biotin inkubiert, anschließend gewaschen und Farbstoff-gekoppeltes Streptavidin (z.B. Streptavidin-APC) dazugegeben.

Zur Detektion von Rhesus-Immunzellen wurde zunächst die Kreuzreaktivität humaner FACS-Antikörper mit Rhesus-Oberflächenantigenen getestet. Eine Hilfestellung leistete hierbei die

Internetseite der Harvard-Universität ([http://research.bidmc.harvard.edu/v\\_path/v\\_pathogens.asp](http://research.bidmc.harvard.edu/v_path/v_pathogens.asp)), auf der die Kreuzreaktivität gebräuchlicher humaner FACS-Antikörper mit verschiedenen Affenarten, u.a. dem Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), angegeben ist. Zur Detektion von dendritischen Blutzellen in Rhesus-PBMC wurde folgendes, dem humanen "Lineage-Cocktail" entsprechendes Antikörper-Cocktail bestehend aus Rhesus-kreuzreaktiven, FITC-konjugierten FACS-Antikörpern zusammengestellt: anti-CD3 (Klon SP34), anti-CD14 (Klon M5E2), anti-CD16 (Klon 3G8) und anti-CD20 (Klon 2H7). Damit konnten alle lineage-positiven Zellen (i.e. T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und B-Zellen) ausgeschlossen werden.

## 2.4 Zytokinbestimmung mit ELISA

### *Konzentrationsbestimmung von Interferon- $\alpha$ und IP-10*

Zur Konzentrationsbestimmung von Interferon- $\alpha$  und IP-10 (*Interferon-inducible protein-10*) wurden fertige ELISA-Kits verwendet. Das Testprinzip des ELISA beruht darauf, dass die im abgenommenen Überstand der Zellkultur gelösten Zytokine an die spezifischen Antikörper, mit denen die ELISA-Platte beschichtet ist (*coating antibody*), binden. Im nächsten Schritt bindet ein zweiter, biotinylierter Antikörper (*detection antibody*) an ein anderes Epitop des an der ELISA-Platte fixierten Zytokins. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wird die Platte mehrmals mit einem Waschpuffer gewaschen. Während der anschließenden Inkubation mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase gehen Streptavidin-Moleküle eine feste Bindung mit den Biotin-Molekülen des *detection-antibody* ein. Die Meerrettichperoxidase katalysiert eine quantifizierbare Farbreaktion mit einem anschließend zugegebenen Farbstoff. Nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure wird die Farbintensität der Proben über deren UV-Absorption mithilfe eines ELISA-Readers bei der im Protokoll des Herstellers empfohlenen Wellenlänge gemessen. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich der UV-Absorption der Proben mit den UV-Absorptionen einer in Doppelwerten angefertigten Standardkurve (=Konzentrationsreihe des entsprechenden rekombinanten Proteins).

Die Kreuzreaktivität der verwendeten humanen ELISA mit Rhesus-Zytokinen war zunächst nicht bekannt und konnte nur anhand des Vergleichs der Messwerte zwischen Mensch und Rhesusaffen abgeschätzt werden. Der in dieser Arbeit zur Detektion von Rhesus-IFN- $\alpha$  verwendete humane IFN- $\alpha$ -ELISA-Kit ist laut Angaben des Herstellers zu 20% kreuzreaktiv mit Rhesus-IFN- $\alpha$  (Firma PBL, New Brunswick, NJ, USA). Folglich liegen die tatsächlichen Rhesus-IFN- $\alpha$ -Werte mindestens fünfmal höher als die erhobenen Messwerte.

### *Konzentrationsbestimmung von Interferon- $\gamma$ , Interleukin-4 und Interleukin-6*

Zur Konzentrationsbestimmung von Interferon- $\gamma$ , Interleukin-4 und Interleukin-6 wurden ELISA-Kits zum Selbstbeschichten verwendet. 96 Well-Maxisorbplatten (Fa. Nunc, Wiesbaden) wurden über Nacht mit Antikörpern (*coating antibody*) gegen das zu messende Zytokin beschichtet (entsprechend dem Protokoll des Herstellers). Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde die Platte am nächsten Tag für mindestens eine Stunde mit einem FCS-haltigen Puffer geblockt, bevor Proben und Standardkurve auf die Well-Platte pipettiert wurden. Das weitere Vorgehen und die Auswertung am ELISA-Reader erfolgte (entsprechend dem Protokoll des Herstellers) wie bei den oben beschriebenen vorbeschichteten ELISA-Kits.

## 2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum Nachweis, ob und in welcher Menge ein bestimmtes Gen in einer Zelle abgelesen wird, wurden die jeweiligen Zellen zunächst lysiert, ihre RNA isoliert und die RNA in cDNA (=komplementäre DNA) umgeschrieben. Anschließend wurde ein spezifischer Abschnitt der gesuchten DNA mit einer PCR amplifiziert und dabei quantifiziert. Im Folgenden wird zunächst die Gewinnung von cDNA für eine PCR beschrieben, anschließend wird auf das allgemeine Funktionsprinzip einer PCR bzw. *real-time* PCR näher eingegangen.

### *Isolation von RNA aus $V\alpha 24^+$ NKT-Zellen*

Zur Isolation von RNA aus  $V\alpha 24^+$  NKT-Zellen wurde der *High-Pure-RNA-Isolation Kit* (Roche, Mannheim) verwendet. Isolierte  $V\alpha 24^+$  NKT-Zellen (ca.  $10^6$ ) wurden für 3 Stunden in RPMI-Vollmedium ohne Stimulus kultiviert (nach (Hornung, 2002)). Zur Extraktion zytoplasmatischer RNA wurden die Zellen einmal in kaltem PBS gewaschen und anschließend in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert. Durch Zugabe von 400  $\mu$ l Lyse-/Bindepuffer erfolgte die Lyse der Zellen und gleichzeitig die Inaktivierung von RNAsen. Die Probe wurde anschließend auf eine Säule mit einem Glasfaservlies gegeben und 15 Sekunden lang bei 8000 g zentrifugiert. Da Nukleinsäuren in dem Glasfaservlies der Säule hängen bleiben, wurde der Durchlauf verworfen. In einer enzymatischen Verdauungsreaktion mit DNase I wurde die RNA-Probe von DNA befreit (Inkubation für 15 min, bei 15-25 °C). Nach drei aufeinander folgenden Waschschritten mit den mitgelieferten Waschpuffern wurde die RNA schließlich mit einem Elutionspuffer aus dem Filter eluiert. Die extrahierte RNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

### *Umschreiben von RNA in cDNA*

Für eine PCR-Amplifikation müssen RNA-Proben in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurde der *1st Strand-cDNA-Synthesis Kit for RT-PCR* (Roche, Mannheim) verwendet. Die RNA-Proben

wurden zusammen mit dem *Master Mix*, bestehend aus Reaktionspuffer, MgCl<sub>2</sub> (25 mM), einem Desoxynukleotid-Mix, Oligo-p(dT)<sub>15</sub> Primer, RNase-Inhibitor und AMV-Reverse Transkriptase (kurz vor der Reaktion zusammenpipettiert), erst für 10 Minuten bei 25 °C, dann für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. In der ersten, kurzen Inkubation binden die Primer an die RNA-Matrize; in der zweiten Inkubation wird die RNA in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss daran wurde die AMV-Reverse Transkriptase durch fünfminütiges Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 95 °C und anschließendes fünfminütiges Abkühlen auf 4 °C denaturiert. Die RT-PCR wurde anschließend mit freundlicher Unterstützung von Dr. Thomas Giese im Institut für Immunologie der Uniklinik Heidelberg durchgeführt.

### *Allgemeines Funktionsprinzip der Polymerase-Kettenreaktion*

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Mithilfe der PCR lässt sich ein spezifisches DNA-Stück aus einem komplexen Nukleinsäuregemisch (genomische DNA, Plasmid-DNA, cDNA) amplifizieren. Die zu amplifizierende DNA-Matrize wird als *template* bezeichnet. Die Reaktion erfolgt mithilfe eines sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaares, das den Enden des *templates* homolog ist, und einer thermostabilen DNA-Polymerase. Die PCR durchläuft drei Schritte: 1.) Denaturierung der DNA-Matrize bzw. bei doppelsträngiger DNA Aufschmelzen der beiden Stränge der DNA-Matrize (Denaturierung). 2.) Spezifische Hybridisierung der Primer an die homologe Zielsequenz auf der DNA (Anlagerung). 3.) Von den Primern ausgehende DNA-Synthese (Elongation). Das neu-synthetisierte DNA-Fragment kann in der darauf folgenden Amplifikationsrunde selbst als Matrize dienen, wodurch in mehreren aufeinander folgenden Zyklen eine exponentielle Anreicherung einer beliebigen DNA-Sequenz möglich ist.

### *Spezifische Quantifizierung von mRNA durch die real-time PCR*

Die PCR wurde in dieser Arbeit angewendet, um eine quantitative Aussage über die mRNA-Expression bestimmter Proteine treffen zu können. Dazu muss die gebildete DNA-Menge während der PCR im Reaktionsansatz gemessen werden. Dies ist mit Hilfe der *real-time* PCR möglich. Vor Beginn der PCR wird zu jeder Probe ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben, der sich nur an doppelsträngige DNA anlagert. Nach jeder Elongationsphase werden die Proben, die sich in Glaskapillaren befinden, mit einem Laser angeregt und emittieren proportional zur gebildeten DNA-Menge ein Signal. Dieses Fluoreszenzsignal wird mit einer entsprechenden Linse gemessen und von einem Computer gespeichert. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität wird gegen die Zykluszahl aufgetragen. Mit geeigneten Referenzproben, deren Kopienzahl bekannt ist, lässt sich auf die ursprüngliche Kopienzahl in der zu untersuchenden Probe zurückschließen. Um letztlich eine quantitative Aussage über die mRNA-Expression eines bestimmten Gens zu erhalten, wird die

gemessene Kopienzahl auf die Transkriptzahl eines sogenannten Referenzgens bezogen, welche in jeder Probe zusätzlich bestimmt wird. Das Referenzgen wird hierbei möglichst so gewählt, dass dessen Expression nicht durch den Versuchsansatz beeinflusst wird. Die Kopienzahlen der in dieser Arbeit detektierten Zielgene wurden auf das Referenzgen *Cyclophilin B* normalisiert und als Kopienzahlen pro 1000 Kopien Cyclophilin B angegeben.

## 2.6 Engerix B-Vakzinierung

### *Durchführung der Vakzinierung*

Der Engerix B-Impfstoff (Engerix B Kinder<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline, München) besteht aus einem rekombinant hergestellten Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) adsorbiert an das Adjuvans Aluminiumhydroxid (Alum). Die Vakzinierung der Rhesusaffen wurde im Deutschen Primatenzentrum (DPZ) in Göttingen mit freundlicher Unterstützung der dortigen Tierärzte und Tierpfleger unter Leitung von Frau Dr. Christiane Stahl-Henning durchgeführt. Gesunde Rhesusaffen (Gewicht 5-8 kg), deren anti-HBs-Antikörper(AK)-Titer zuvor untersucht und als negativ befunden worden waren, wurden zweimal (d0 und d28) mit einer pädiatrischen Dosis von 10 µg Engerix B alleine (w/o CpG), 10 µg Engerix B plus 250 µg ODN 2006 (CpG-B) bzw. 10 µg Engerix B plus 250 µg ODN 2216 (CpG-A) geimpft. Das Gesamtinjektionsvolumen betrug bei allen Gruppen 600 µl. Die Vakzinierung erfolgte tief intramuskulär (i.m.) in die lange Sitzbeinmuskulatur des Oberschenkels. Jede Versuchsgruppe setzte sich aus zwei Rhesusaffen zusammen ( $n=2$ ). Die Tiere wurden regelmäßig tierärztlich untersucht. Es traten keine Krankheitssymptome oder lokale Unverträglichkeitsreaktionen an der Einstichstelle auf. Vor jeder Impfung und an den angegebenen Zeitpunkten (d0 vor Impfung, d1, d3, d28 vor Boost, d29, d31) wurde den Affen 1,25-2 ml venöses Blut abgenommen und daraus durch Zentrifugation (30 min, 1000 g, 20 °C) das Plasma gewonnen.

### *Bestimmung der anti-HBs-Antikörper-Titer*

Ein positives Ansprechen auf eine Hepatitis B-Vakzinierung resultiert in der Entwicklung von Antikörpern gegen das Hepatitis B-Oberflächenantigen (anti-HBs-AK). Die anti-HBs-AK-Titer werden entsprechend den Standard-Definitionen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Milliinternationale Einheiten pro Milliliter (mIU/ml) angegeben. Anti-HBs-AK-Titer >10 mIU/ml bewirken einen Schutz vor einer Hepatitis B-Infektion (Seroprotektion) (Hadler, 1986; Davis, 2000). Zur Bestimmung der anti-HBs-AK-Titer im Plasma der geimpften Affen wurde ein kommerziell erhältlicher Immunoassay verwendet (AxSYM<sup>®</sup>, Abbott, Wiesbaden), der routinemäßig in der Hepatitis B-Diagnostik eingesetzt wird und die Bestimmung der anti-HBs-AK-

Titer in Plasma- und Serumproben ermöglicht. Die Plasmaproben der Tiere wurden bis zur Durchführung des Assays bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Bestimmung der anti-HBs-AK-Titer wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. Ralf Ignatius im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie der Charité (Berlin) durchgeführt.

## 2.7 Experimente mit CpG-ODN in Vollblut, Plasma und Serum


Um eine intravenöse CpG-Gabe zu simulieren, wurden humanes Vollblut bzw. humane PBMC mit Zusätzen von autologem Plasma bzw. Serum *in vitro* mit CpG-ODN ( $3\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Zur Überprüfung der Immunstimulation wurden nach zwei Tagen IFN- $\alpha$  und IP-10 im Kulturüberstand mit ELISA gemessen. - In den Versuchen mit humanem Vollblut wurde frisch abgenommenes heparinisierendes Spenderblut auf 24-Well-Platten ausplattiert ( $1\text{ ml}$  Vollblut/well). Erfahrungsgemäß sind in  $1\text{ ml}$  frischem Spenderblut mindestens  $1\text{ Mio}$  PBMC enthalten. Um den Einfluss von Plasma bzw. Serum auf die IFN- $\alpha$ -Produktion von PBMC zu untersuchen, wurden PBMC ( $1\text{ Mio/ml}$ ) mit steigenden Anteilen von Plasma bzw. Serum ( $10, 50, 100\text{vol}\%$ ) in Anwesenheit von CpG-ODN kultiviert. Plasma wurde durch Zentrifugation von antikoaguliertem Vollblut gewonnen ( $30\text{ min}$ ,  $1000\text{ g}$ ,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Zur Gewinnung von Serum wurde nicht-antikoaguliertes Vollblut nach der Abnahme zunächst für  $30\text{ min}$  bei Raumtemperatur stehen gelassen (Gerinnung) und anschließend ebenfalls bei  $1000\text{ g}$   $30\text{ min}$  lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zur Inaktivierung von hitzelabilen Proteinen wurde das Serum zunächst eine Stunde lang bei  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt, bevor es PBMC in verschiedenen Anteilen ( $100$  bzw.  $50\text{vol}\%$ ) zugesetzt wurde. - Als Kontrolle wurden von jedem Spender PBMC ( $1\text{ Mio/ml}$ ) in RPMI-Vollmedium ebenfalls zwei Tage lang mit CpG-ODN ( $3\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert und der Kulturüberstand anschließend auf Zytokine untersucht.

## 2.8 SIV-Assay zur Untersuchung der antiviralen Aktivität von CpG-ODN

Die antiviralen Eigenschaften von CpG-induzierten löslichen Faktoren (CpG CM, Gewinnung s. 2.2) wurden anhand deren Fähigkeit, eine SIV-permissive humane  $\text{CD4}^+$  T-Zelllinie (C8166) vor der Infektion mit *Simian immunodeficiency virus* (SIV) zu schützen, untersucht. Der SIV-Assay wurde im Deutschen Primatenzentrum (DPZ) in Göttingen mit freundlicher Unterstützung von Manuel Rebelo und Dr. Christiane Stahl-Henning folgendermaßen durchgeführt: C8166 T-Zellen ( $600\text{ }000\text{ T-Zellen/ml}$ ) wurden mit dem SIV-Stamm SIVmac239 in der An- bzw. Abwesenheit von 2216 CM, 2006 CM (beide  $50\text{vol}\%$ ) bzw. rekombinantem humanen IFN- $\alpha$  ( $500\text{ U/ml}$ ) in  $100\text{ }\mu\text{l}$  Volumen kultiviert. Der Virus wurde ausgehend von einem Virustiter von  $10^2\text{ Mio/ml}$  ( $=10^2\text{ Mio Viruspartikel/ml}$ ) für alle Bedingungen in Zehnerpotenz-Schritten bis zu einem Virustiter von  $10^{-7}$



Mio/ml verdünnt (s. Abb. 3). Alle Bedingungen wurden jeweils vierfach angesetzt (Vierer-Werte). Als Negativkontrolle wurde jede Bedingung ohne Virus angesetzt. Nach drei Tagen wurde das Medium gewechselt, indem 50 µl des gebrauchten Mediums verworfen und durch 100 µl frisches Medium mit denselben Zusätzen wie am Tag 0 (50vol% des jeweiligen CpG CM bzw. 500 U/ml IFN- $\alpha$ ) ersetzt wurde. Am Tag 7 wurden die T-Zellen geerntet, gewaschen und auf einer Con-A(Concanavalin-A)-beschichteten well-Platte fixiert. Die Zellmembran wurde durch Methanol permeabilisiert. Zur Detektion von intrazellulärem SIV wurden anti-SIV-Antikörper (Serum eines SIV-infizierten Rhesusaffen mit hohem anti-SIV-AK-Titer) mit den fixierten und permeabilisierten T-Zellen 30 min lang inkubiert. Die Platte wurde dreimal gewaschen und mit einem HRPO(Horseradish Peroxidase)-konjugierten Sekundärantikörper für 30 min inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde ein Substrat zugegeben, das kurz zuvor aus 2 mg AEC (Aminoethylcarbazol), 300 µl DMF (Dimethylformamid), 25 µl 3%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung und 5 ml Na-Acetat-Lösung (Ansatz Substrat für eine Platte) selbst hergestellt wurde. Die Reaktion des Substrates mit HRPO induzierte eine Färbung der SIV-infizierten Zellen. Nach 20 min wurden die Zellen gewaschen und im Lichtmikroskop bei 10-(10x) und 40-(40x)facher Vergrößerung untersucht. SIV-infizierte T-Zellen waren dunkelviolet bis bräunlich gefärbt; nicht-infizierte Zellen waren ungefärbt und hell. Um eine quantitative Aussage machen zu können, in welchem Ausmaß die Anwesenheit von CpG CM bzw. IFN- $\alpha$  eine Ausbreitung des Virus inhibiert, wurde für alle Bedingungen der Virustiter bestimmt, ab dem T-Zellen infiziert werden. Dazu wurde zunächst durch Untersuchung im Mikroskop ermittelt, ab welchem Virustiter keine infizierten Zellen mehr sichtbar waren. Dazu wurden die well-Platten von der höchsten Viruskonzentration ausgehend in Richtung absteigende Virustiter begutachtet (s. Abb. 3: abgebildete well-Platte von links nach rechts). Bei dem Virustiter, bei dem gerade noch einzelne Zellen SIV-infiziert waren, wurden die infizierten Zellen ausgezählt und der Mittelwert aus den Vierer-Werten gebildet. Mithilfe dieser beiden Messgrößen (Höhe des Virustiters, bei dem gerade noch Zellen infiziert sind, und die durchschnittliche Anzahl der bei diesem Virustiter infizierten Zellen) wurde für jede Behandlung nach der Methode von Reed & Muench (Reed, 1938) der Virustiter bestimmt, ab dem T-Zellen infiziert werden. Je effektiver eine Behandlung den Virus hemmen konnte, desto höhere Virustiter waren erforderlich, um die T-Zellen zu infizieren (Beispiel: infektiöser Virustiter ohne Behandlung: 10<sup>-6</sup> Mio/ml; mit Behandlung: 10<sup>-4</sup> Mio/ml).

Abnehmende Viruskonzentration ( $10^{-x}$ Mio/ml) 						kein Virus (Negativ-Kontrolle)
-2	-3	-4	-5	-6	-7	-
-2	-3	-4	-5	-6	-7	-
-2	-3	-4	-5	-6	-7	-
-2	-3	-4	-5	-6	-7	-

**Abb. 3: Well-Platte beim SIV-Assay zur Untersuchung der antiviralen Aktivität von CpG CM.** SIV wurde jeweils für alle Bedingungen (SIV alleine; SIV plus 2216 CM; SIV plus 2006 CM; SIV plus IFN- $\alpha$ ) ausgehend von dem Virustiter  $10^{-2}$  Mio/ml in Zehnerpotenzen bis  $10^{-7}$  Mio/ml verdünnt. Jede Bedingung wurde einmal ohne Viruszusatz angesetzt (Negativ-Kontrolle). Alle Bedingungen wurden in Vierer-Werten angesetzt.

## 2.9 Statistische Analysen

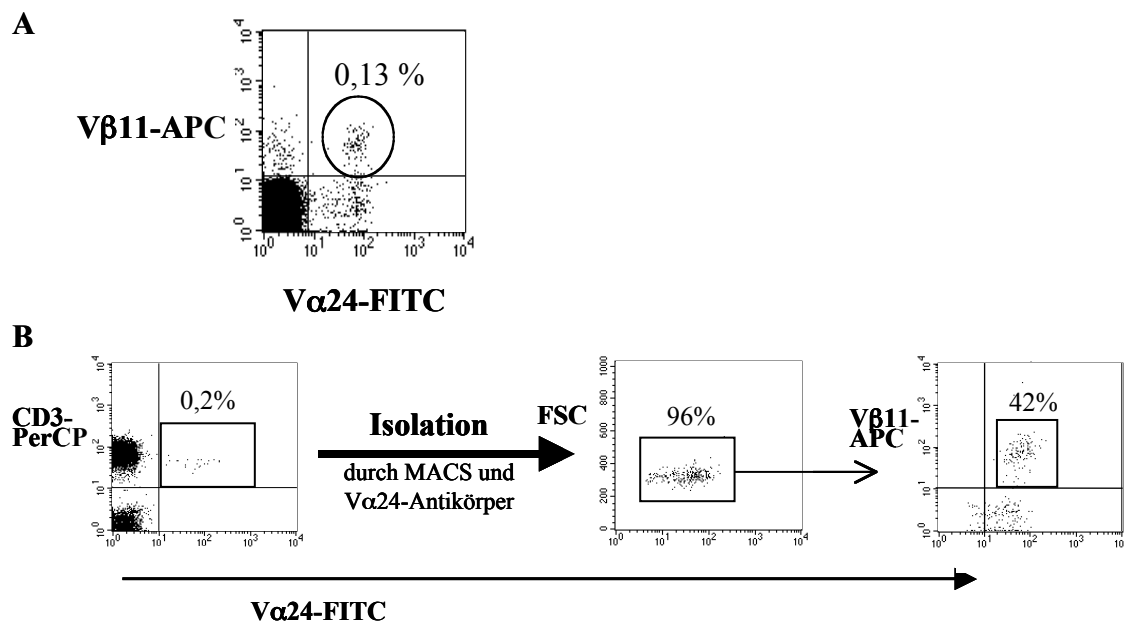
Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (*Standard error of mean* = Standardfehler des Mittels) angegeben. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des zweiseitigen Student-t-Test für gepaarte Stichproben und dem Wilcoxon-Rank-Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten  $<0,05$  (signifikant) bzw  $p < 0,01$  (hoch signifikant) angenommen und ist durch Markierung mit \* bzw. \*\* angezeigt. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm StatView D-4.5 (Abacus Concepts, CA, USA) durchgeführt. Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint (Microsoft Cooperation, CA, USA).

### 3 ERGEBNISSE

#### Teil I: Aktivierung humaner NKT-Zellen durch CpG-ODN und $\alpha$ -GalCer

##### 3.1 Detektion und Anreicherung humaner NKT-Zellen

Humane NKT-Zellen exprimieren einen semi-invarianten T-Zell-Rezeptor (TCR) bestehend aus einer spezifischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette:  $V\alpha 24/V\beta 11$  (Dellabona, 1994). Mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen  $V\alpha 24$  und  $V\beta 11$  können NKT-Zellen im Durchflusszytometer sehr spezifisch detektiert werden (Prussin, 1997). Im humanen peripheren Blut exprimierten durchschnittlich 0,3% ( $\pm 0,04\%$ ;  $n=24$ ) aller  $CD3$ -positiven Lymphozyten die NKT-Zell-spezifische  $V\alpha 24$ -Kette. Nur ein Teil der  $CD3^+/V\alpha 24^+$  Zellen trug gleichzeitig die  $V\beta 11$ -Kette (s.u.). Abbildung 4A zeigt die  $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$  NKT-Zellpopulation eines repräsentativen Spenders (0,13% in PBMC).



**Abb. 4: Detektion und Anreicherung von humanen NKT-Zellen aus dem peripheren Blut.** **A:** Die Frequenz humaner NKT-Zellen im peripheren Blut wurde durch Anfärbung des spezifischen T-Zell-Rezeptors ( $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$ ) im Durchflusszytometer bestimmt. Der Dot Plot zeigt die  $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$  NKT-Zell-Population eines repräsentativen Spenders (0,13%  $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$  NKT-Zellen in PBMC). **B:** Dot Plot-Darstellung der Aufreinigung humaner NKT-Zellen aus dem peripheren Blut. Die NKT-Zell-Isolation eines repräsentativen Spenders ist abgebildet. Die Frequenz der  $V\alpha 24^+$  Zellen im peripheren Blut betrug bei diesem Spender zunächst 0,2%. Die Isolation von NKT-Zellen erfolgte nach dem MACS-Prinzip mit  $V\alpha 24$ -Antikörpern, die sich gegen die  $V\alpha 24$ -Kette des T-Zell-Rezeptors der Zellen richten. Durch Aufreinigung wurden  $V\alpha 24^+$  NKT-Zellen mit einer Reinheit von 96% selektioniert. Anschließend wurden die  $V\alpha 24^+$  Zellen mit  $V\beta 11$ -APC angefärbt. 42% der isolierten  $V\alpha 24^+$  NKT-Zellen dieses Spenders exprimierten  $V\beta 11$  und waren somit  $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$  doppelt positive NKT-Zellen.

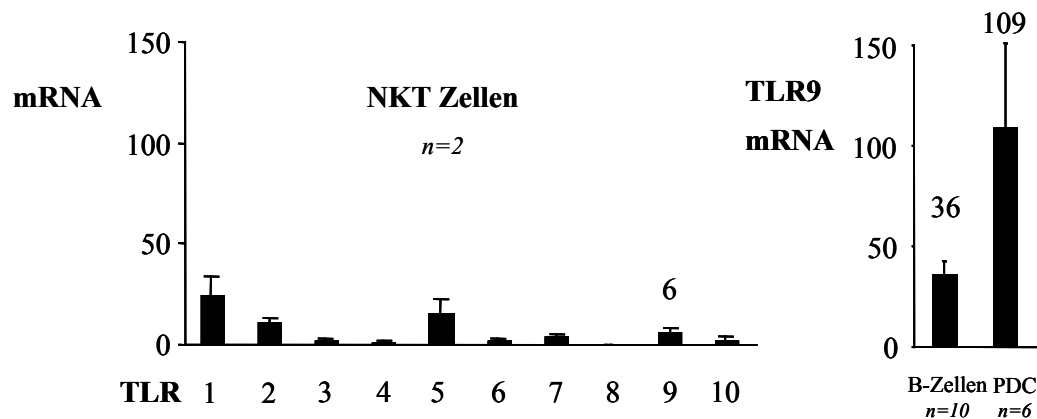
Aufgrund der niedrigen Frequenz und der spenderabhängig sehr variablen NKT-Zellzahl im peripheren Blut sowie aufgrund des Phänomens des "*Activation-induced Cell Death*" lassen sich NKT-Zellen innerhalb von PBMC zwei Tage nach Stimulation im Durchflusszytometer nur schwer detektieren und funktionell charakterisieren. Durch die Erarbeitung und Etablierung eines neuen Protokolls zur Aufreinigung bzw. Anreicherung von humanen NKT-Zellen gelang es, dieses methodische Problem zu lösen. Wie unter Material und Methoden beschrieben, konnten durch die magnetische Markierung der NKT-spezifischen V $\alpha$ 24-Kette und Isolation im Magnetfeld humane V $\alpha$ 24<sup>+</sup> NKT-Zellen mit hohen Reinheitsgraden (bis zu 96%) isoliert werden. Dabei exprimierten im Durchschnitt 45% ( $\pm 11,7\%$ ;  $n=6$ ) der aufgereinigten V $\alpha$ 24<sup>+</sup> Zellen gleichzeitig V $\beta$ 11 (Abb. 4B). Mithilfe dieser Methode wurden in den folgenden beschriebenen Experimenten je nach Fragestellung isolierte V $\alpha$ 24<sup>+</sup> NKT-Zellen oder zur besseren Detektierung und funktionellen Charakterisierung auf etwa 10% NKT-Zellen angereicherte PBMC eingesetzt.

### 3.2 TLR-Expression in humanen NKT-Zellen

Die Erkennung von CpG-Motiven als molekulares Muster einer mikrobiellen Infektion erfolgt im Vertebraten-Immunsystem über Toll-like Rezeptor 9 (Hemmi, 2000). Im humanen System ist TLR9 nur auf B-Zellen und PDC nachgewiesen worden (Hornung, 2002). Bisher war unbekannt, ob NKT-Zellen TLR9 exprimieren und damit in der Lage sind, direkt auf CpG-Stimulation zu reagieren. Daher wurde das TLR-Expressionsprofil, insbesondere die Expression von TLR9, in NKT-Zellen mithilfe der Real-Time PCR untersucht (Abb. 5). V $\alpha$ 24<sup>+</sup> NKT-Zellen zeigten generell eine niedrige TLR-Expression. In geringem Ausmaß exprimierten sie TLR1 und 5. Im Durchschnitt exprimierten V $\alpha$ 24<sup>+</sup> NKT-Zellen 6 ( $\pm 2,7$ ;  $n=2$ ) Kopien TLR9 pro 10<sup>3</sup> Kopien des Housekeeping-Gens Cyclophilin B. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den beiden Positivkontrollen, TLR9-exprimierenden B-Zellen und PDC (B-Zellen: 36  $\pm$  6 Kopien,  $n=10$ ; PDC: 109  $\pm$  42 Kopien,  $n=6$  (Hornung, 2002)), ist die TLR9-Expression in NKT-Zellen mit <10 TLR9-Kopien als negativ zu bewerten.

Es ist bekannt, dass auch konventionelle NK-Zellen sowie  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma/\delta$ -T-Zellen kein TLR9 exprimieren und daher nicht direkt auf CpG-Stimulation reagieren (Hornung, 2002). NK-Zellen und T-Zellen werden jedoch sekundär, über CpG-stimulierte B-Zellen und PDC aktiviert (Rothenfusser, 2001). Um ebensolche CpG-induzierten indirekten Effekte zu berücksichtigen, wurden NKT-Zellen innerhalb von PBMC mit CpG-ODN stimuliert. Zur leichteren Detektion der NKT-Zellen und ihrer Effekte wurde ihr Prozentsatz innerhalb von PBMC - wie unter Abschnitt 3.1 beschrieben - erhöht, indem 20 000-50 000 aufgereinigte NKT-Zellen mit 400 000 autologen

PBMC kokultiviert wurden (Endkonzentration: 5-10% V $\alpha$ 24<sup>+</sup> Zellen in PBMC = *angereicherte NKT-Zellen*).



**Abb. 5: TLR-Expression in humanen NKT-Zellen.** Expression von TLR1-10 in NKT-Zellen, angegeben als Transkripte/10<sup>3</sup> Kopien des Housekeeping-Gens Cyclophilin B (links). Zum Vergleich sind die TLR9-mRNA-Kopien in den CpG-Zielzellen, B-Zellen und PDC, dargestellt (rechts). Die Zellpopulationen (NKT-Zellen, B-Zellen und PDC) wurden jeweils nach dem MACS-Prinzip aufgereinigt (s. Material und Methoden, S. 36). Die TLR-Expression verschiedener Spender wurde gemittelt (NKT-Zellen, n=2; B-Zellen, n=10; PDC, n=6).

### 3.3 Stimulation humaner NKT-Zellen mit CpG-ODN und $\alpha$ -GalCer

Vorbereitend für einen kombinierten Einsatz der beiden Adjuvantien CpG-ODN und  $\alpha$ -GalCer sollte untersucht werden, ob NKT-Zellen bereits durch CpG-Stimulation innerhalb von PBMC stimuliert werden und ob CpG-ODN die  $\alpha$ -GalCer-spezifische NKT-Zellaktivierung synergistisch steigern. Dabei sollte die Aktivität der beiden distinkten CpG-Klassen A und B miteinander verglichen werden. Darüber hinaus sollten auch grundsätzliche Erkenntnisse gewonnen werden, über welche Mechanismen CpG-ODN Memory-T-Zellen, wie NKT-Zellen, aktivieren.

Angereicherte NKT-Zellen wurden mit CpG-A (ODN 2216) oder CpG-B (ODN 2006) jeweils in An- oder Abwesenheit des NKT-Zell-spezifischen Antigens  $\alpha$ -GalCer für zwei Tage stimuliert. Anschließend wurde die Expression des Lymphozyten-Aktivierungsmarkers CD69 auf V $\alpha$ 24<sup>+</sup>/V $\beta$ 11<sup>+</sup> NKT-Zellen gemessen und IFN- $\gamma$  im Kulturüberstand bestimmt. Sowohl CpG-A als auch CpG-B bewirkten bereits in Abwesenheit eines Antigen-Stimulus im Vergleich zur Medium-Kontrolle eine Aufregulation von CD69 auf NKT-Zellen, wobei ODN 2216 einen stärkeren Effekt erzielte als ODN 2006 (Abb. 6B, w/o  $\alpha$ -GalCer). In Abwesenheit des Antigens wurden in den Zellkulturüberständen von angereicherten NKT-Zellen nach CpG-Stimulation auch signifikante Mengen des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$  gemessen, wobei ODN 2216 höhere Mengen an IFN- $\gamma$  induzierte

als ODN 2006 (Abb. 6C, w/o  $\alpha$ -GalCer; Medium:  $39 \pm 27$  pg/ml; ODN 2006:  $118 \pm 55$  pg/ml; ODN 2216:  $163 \pm 60$  pg/ml;  $n=19$ ).

Durch Kostimulation mit dem Antigen  $\alpha$ -GalCer und CpG-ODN konnte die Antigen-spezifische Aktivierung von NKT-Zellen noch synergistisch gesteigert werden. Dies drückte sich sowohl in der CD69-Expression als auch in der IFN- $\gamma$ -Produktion von NKT-Zellen aus. Abbildung 6A zeigt eine Dot Plot-Darstellung der CD69-Expression auf NKT-Zellen eines repräsentativen Spenders nach  $\alpha$ -GalCer  $\pm$  CpG-Stimulation. Nach Stimulation mit dem spezifischen Ag  $\alpha$ -GalCer exprimierten 37% der NKT-Zellen dieses Spenders CD69. Nach  $\alpha$ -GalCer/ODN 2216-Kostimulation waren dagegen mehr als 90% der NKT-Zellen dieses Spenders CD69<sup>+</sup>. Die Ergebnisse der CD69-Expression bzw. IFN- $\gamma$ -Produktion von NKT-Zellen mehrerer Spender nach Kostimulation mit CpG/ $\alpha$ -GalCer sind in Abbildung 6B (+ $\alpha$ -GalCer) bzw. 6C (+ $\alpha$ -GalCer) zusammengefasst. Obwohl beide CpG-Typen die Antigen-spezifische Aktivierung der NKT-Zellen signifikant verstärkten, wurde konsistent ein größerer Synergismus zwischen  $\alpha$ -GalCer und dem Typ-I-IFN-induzierenden CpG-A (ODN 2216) bei der CD69- und IFN- $\gamma$ -Induktion in NKT-Zellen beobachtet.

NKT-Zellen können je nach Art eines Stimulus und des umgebenden Milieus Th1- oder/und Th2-Zytokine produzieren (Godfrey, 2000). Um herauszufinden, ob NKT-Zellen durch CpG-Stimulation in Th1- oder Th2-Richtung differenzieren, wurden Th1-(IFN- $\gamma$ ) und Th2-(IL-4) Zytokine im Zellkultur-Überstand von angereicherten NKT-Zellen nach  $\alpha$ -GalCer/CpG-Stimulation bestimmt. Neben hohen Mengen an IFN- $\gamma$  wurden nur marginale Mengen des Th2-Zytokins IL-4 durch  $\alpha$ -GalCer/CpG-Stimulation induziert (Abb. 6C). Folglich bewirkte die Kostimulation mit  $\alpha$ -GalCer/CpG-ODN eine deutliche Th1-Differenzierung von NKT-Zellen.

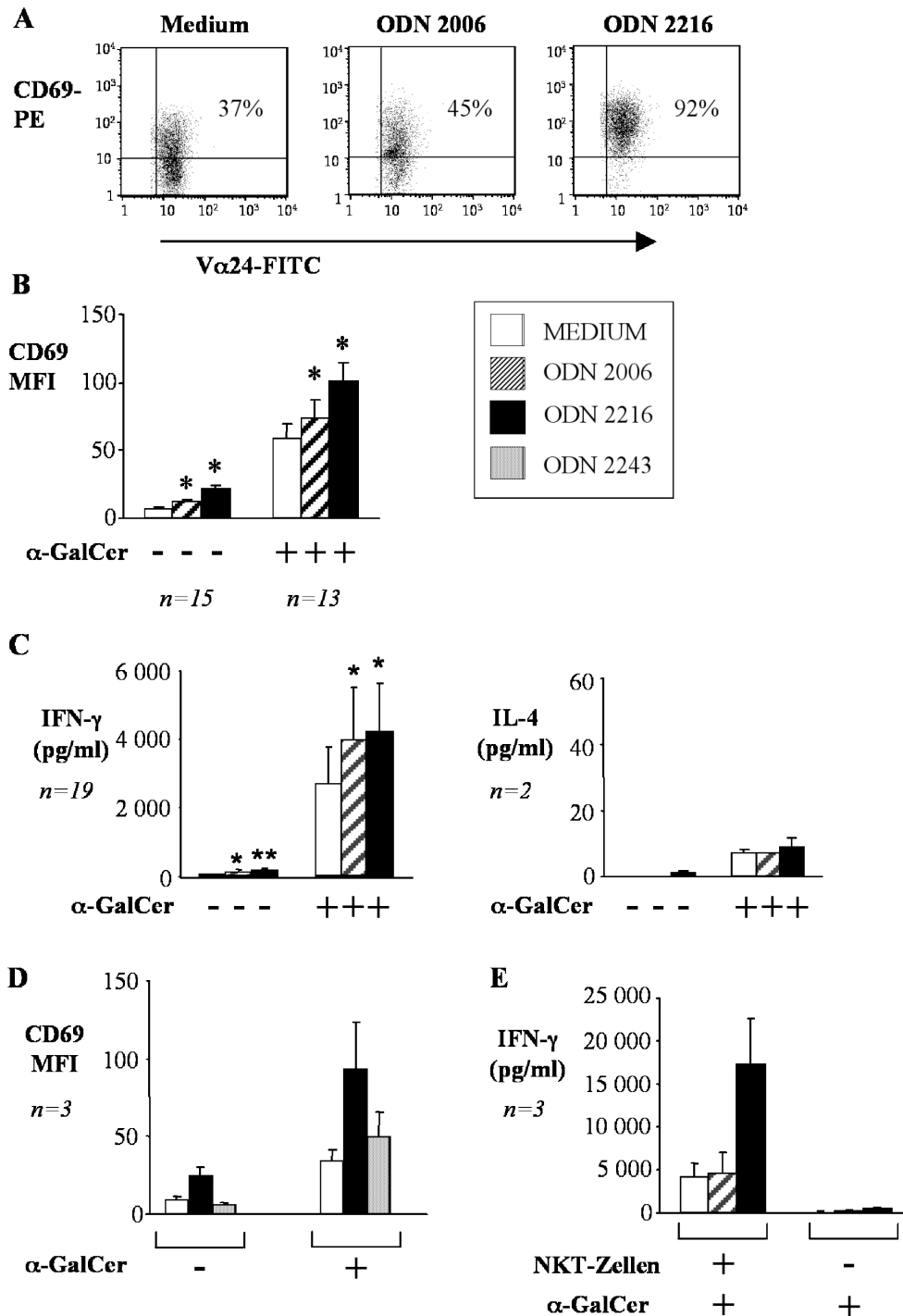
Die GC-Kontrolle (ODN 2243) zu ODN 2216 bewirkte in An- bzw. Abwesenheit von  $\alpha$ -GalCer keine Aufregulation von CD69 auf NKT-Zellen (Abb. 6D). Folglich ist die Aktivierung von NKT-Zellen durch CpG-ODN von der Anwesenheit von CpG-Motiven innerhalb der Oligonukleotide abhängig und damit CpG-spezifisch.

Die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-4 wurden in den Kulturüberständen von angereicherten NKT-Zellen im ELISA bestimmt. Theoretisch könnten daher außer NKT-Zellen noch andere Zellen innerhalb von PBMC zur Zytokin-Produktion beigetragen haben. Um zu untersuchen, welchen Anteil NKT-Zellen an der IFN- $\gamma$ -Produktion nach CpG/ $\alpha$ -GalCer-Stimulation haben, wurden PBMC mit angereicherten NKT-Zellen oder normale PBMC desselben Spenders mit CpG-ODN plus  $\alpha$ -GalCer stimuliert. Nach zwei Tagen wurde IFN- $\gamma$  in den Kulturüberständen bestimmt. In den Überständen von normalen PBMC befand sich im Vergleich zu Kulturüberständen von angereicherten NKT-Zellen desselben Spenders kaum IFN- $\gamma$  nach  $\alpha$ -GalCer  $\pm$  CpG-Stimulation (Abb. 6E). Hohe Mengen an IFN- $\gamma$  wurden demnach nur dann beobachtet, wenn (1) das NKT-Zell-

spezifische Antigen  $\alpha$ -GalCer anwesend war (Abb. 6B) und (2) die Prozentzahl von NKT-Zellen innerhalb von PBMC erhöht war (Abb. 6E).

Diese Ergebnisse bestätigen, (i) dass das Glykolipid-Antigen  $\alpha$ -GalCer spezifisch von NKT-Zellen erkannt wird und (ii) dass das nach CpG/ $\alpha$ -GalCer-Stimulation in den Kulturüberständen gemessene IFN- $\gamma$  in erster Linie von NKT-Zellen produziert wird.

Da CpG-A (ODN 2216) im Vergleich zu CpG-B (ODN 2006) konsistent eine stärkere, Th1-gerichtete NKT-Zell-Aktivierung induzierte und einen größeren Synergismus mit  $\alpha$ -GalCer zeigte, wurde in den nachfolgenden Experimenten, in denen der Mechanismus der CpG-vermittelten NKT-Zell-Aktivierung analysiert werden sollte, vorwiegend ODN 2216 verwendet.



**Abb. 6: CpG-ODN induzieren CD69 auf NKT-Zellen und verstärken eine Th1-gerichtete Antigen-spezifische Aktivierung von NKT-Zellen.** Angereicherte NKT-Zellen in PBMC wurden mit verschiedenen ODN für zwei Tage stimuliert, jeweils in An- oder Abwesenheit des NKT-Zell-spezifischen Antigens  $\alpha$ -Galaktosylceramid ( $\alpha$ -GalCer). **A:** Dot Plot-Darstellung der CD69-Expression auf NKT-Zellen eines repräsentativen Spenders nach Stimulation mit  $\alpha$ -GalCer  $\pm$  CpG-ODN. Das Gate im Durchflusszytometer wurde auf  $CD3^+/V\alpha 24^+$  Zellen gesetzt. **B:** CD69-Expression auf NKT-Zellen nach Stimulation mit CpG-ODN  $\pm$   $\alpha$ -GalCer (ohne  $\alpha$ -GalCer ( $n=15$ ); mit  $\alpha$ -GalCer ( $n=13$ )). **C:** Messung von IFN- $\gamma$  ( $n=19$ ) und IL-4 ( $n=2$ ) in den Kulturüberständen von angereicherten NKT-Zellen nach Stimulation mit CpG-ODN  $\pm$   $\alpha$ -GalCer. **D:** CD69-Expression auf NKT-Zellen nach Inkubation mit ODN 2216 bzw. dem GC-Kontroll-ODN 2243  $\pm$   $\alpha$ -GalCer ( $n=3$ ). **E:** IFN- $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit CpG-ODN  $\pm$   $\alpha$ -GalCer in angereicherten NKT-Zellen (NKT +) oder in normalen PBMC (NKT -) desselben Spenders; ( $n=3$ ). - Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* bzw. \*\* kennzeichnen ( $p<0,05$ ) bzw. ( $p<0,01$ ).

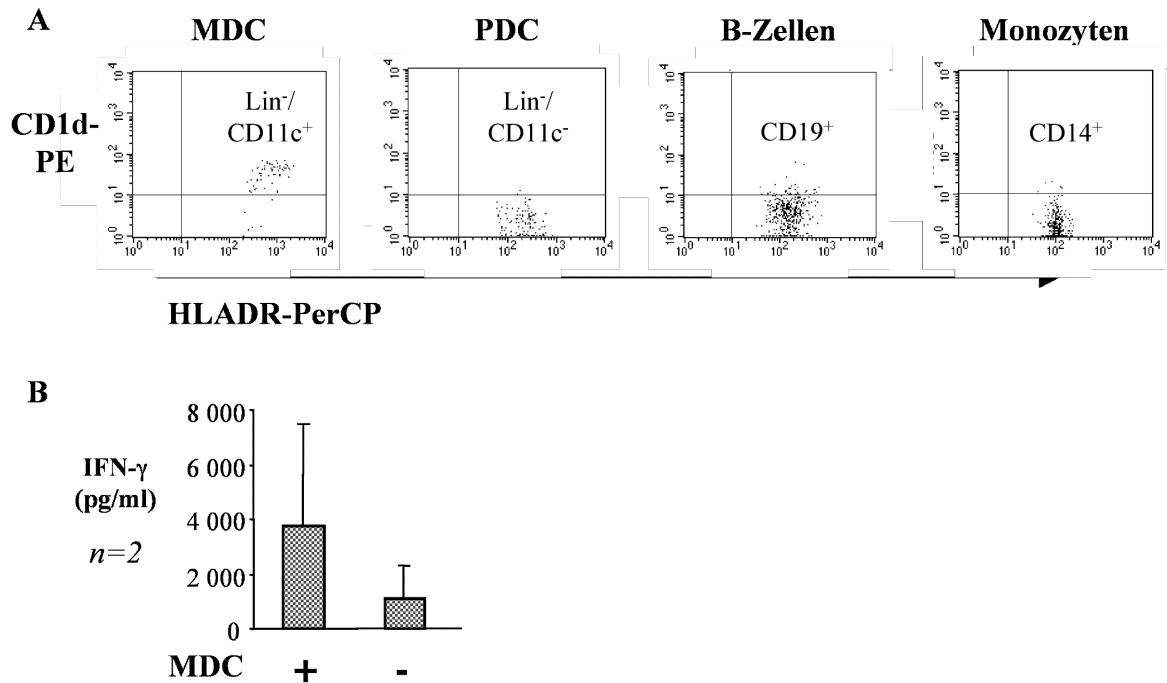


### 3.4 Mechanismen der Aktivierung humaner NKT-Zellen durch $\alpha$ -GalCer und CpG-ODN

#### 3.4.1 CD1d-Expression auf Antigen-präsentierenden Zellen und Beteiligung der myeloiden DC an der $\alpha$ -GalCer-spezifischen NKT-Zell-Aktivierung

Das Glykolipid-Antigen  $\alpha$ -GalCer wird über MHC-I-ähnliche CD1d-Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert. Der  $\alpha$ -GalCer/CD1d-Komplex wird spezifisch von NKT-Zellen erkannt (Kawano, 1997; Brossay, 1998). Da CpG-ODN die Antigen-spezifische NKT-Zell-Aktivierung verstärken, stellte sich die Frage, ob die beiden humanen CpG-Zielzellen, B-Zellen und PDC, CD1d-Moleküle tragen und somit zur  $\alpha$ -GalCer-Präsentation fähig sind. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welche anderen APC im peripheren Blut CD1d exprimieren und damit möglicherweise an der  $\alpha$ -GalCer-spezifischen Aktivierung von NKT-Zellen beteiligt sind. In frisch isolierten PBMC exprimierten weder PDC, noch B-Zellen oder Monozyten CD1d (Abb. 7A). Als einzige APC-Population im peripheren Blut exprimierten myeloide DC CD1d. Aus Monozyten *in vitro* generierte DC zeigten erst nach Ausreifung eine schwache Expression von CD1d (Daten nicht abgebildet). B-Zellen und PDC exprimierten auch 48 Stunden nach *in vitro*-Aktivierung mit CpG-ODN kein CD1d (Daten nicht abgebildet).

Da gemäß der FACS-Analyse nur MDC im peripheren Blut CD1d exprimieren, sollte durch Depletion der MDC deren funktionelle Bedeutung in der  $\alpha$ -GalCer-spezifischen NKT-Zell-Aktivierung überprüft werden. In der Tat kam es nach MDC-Depletion zu einer drastischen Reduktion der IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen bei Stimulation mit  $\alpha$ -GalCer (Abb. 7B). Demnach sind MDC unmittelbar an der Antigen-spezifischen Aktivierung von humanen NKT-Zellen im peripheren Blut beteiligt, da sie das Antigen von NKT-Zellen CD1d-gebunden präsentieren können.



**Abb. 7: MDC exprimieren CD1d und sind an der Antigen-spezifischen Aktivierung von NKT-Zellen beteiligt.** **A:** Humane MDC, PDC, B-Zellen und Monozyten wurden im Durchflusszytometer auf CD1d-Expression untersucht. Zur Detektion von MDC und PDC wurden PBMC mit lineage<sup>FITC</sup>, anti-HLADR<sup>PerCP</sup> und anti-CD11c<sup>APC</sup> gefärbt. Lymphozyten wurden anhand von Forward/Sideward Scatter-Charakteristika gated. Innerhalb des Lymphozyten-Gates wurden lineage<sup>-</sup>/HLADR<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> Zellen als MDC und lineage<sup>-</sup>/HLADR<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup> als PDC definiert. Zur Detektion von B-Zellen bzw. Monozyten wurden PBMC mit anti-HLADR<sup>PerCP</sup> und anti-CD19<sup>APC</sup> bzw. anti-HLADR<sup>PerCP</sup> und anti-CD14<sup>FITC</sup> gefärbt. Alle Zellpopulationen wurden außerdem mit CD1d-PE angefärbt. Im Durchflusszytometer wurde jeweils auf die zu untersuchende Zellpopulation ein Gate gesetzt. Die Dot Plots eines repräsentativen Spenders (von n=5) sind abgebildet. **B:** Nach dem MACS-Prinzip wurden zunächst MDC aus PBMC positiv selektiert (s. Material und Methoden, S. 36); die MDC-depletierte PBMC-Fraktion sowie unveränderte PBMC desselben Spenders wurden weiterverwendet. Angereicherte NKT-Zellen wurden innerhalb normaler PBMC (MDC+) oder innerhalb der MDC-depletierten PBMC (MDC-) mit  $\alpha$ -GalCer stimuliert. Nach zwei Tagen wurde IFN- $\gamma$  im Zellkulturüberstand über ELISA gemessen (n=2).

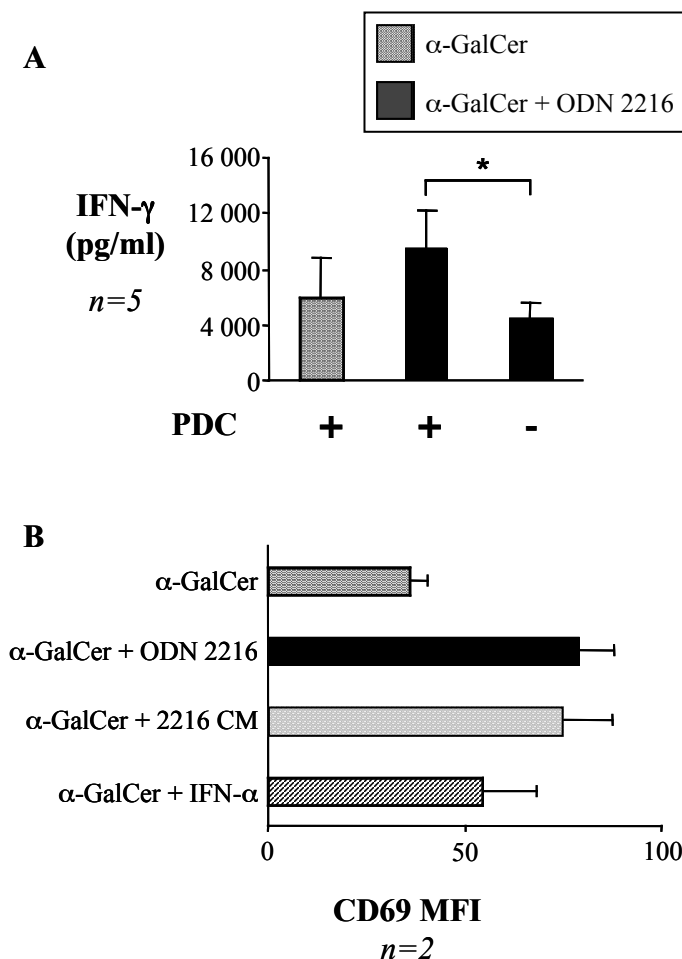
### 3.4.2 Beteiligung der plasmazytoiden DC an der CpG-vermittelten Aktivierung von NKT-Zellen via IFN- $\alpha$

NKT-Zellen exprimieren kein TLR9 und reagieren daher nicht direkt auf CpG-Stimulation (Abb. 5). Die einzigen TLR9-tragenden Zellen in humanen PBMC sind bisher PDC und B-Zellen (Hornung, 2002). Die beobachteten CpG-Effekte auf humane NKT-Zellen müssen daher indirekt, über CpG-aktivierte PDC und/oder B-Zellen vermittelt werden. CpG-A (ODN 2216), das maximale IFN- $\alpha$ -Produktion in PDC induziert, aktivierte NKT-Zellen stärker als CpG-B (ODN 2006), das in erster Linie B-Zellen aktiviert (s. Abb. 6A-C). Daher wurde vermutet, dass PDC über ihre IFN- $\alpha$ -Produktion an der CpG-induzierten NKT-Zell-Aktivierung beteiligt sind. Um diese These zu bestätigen, wurden PDC von PBMC depletiert und angereicherte NKT-Zellen innerhalb PDC-depletierter PBMC mit  $\alpha$ -GalCer und CpG-ODN stimuliert. Die PDC-Depletion führte zu

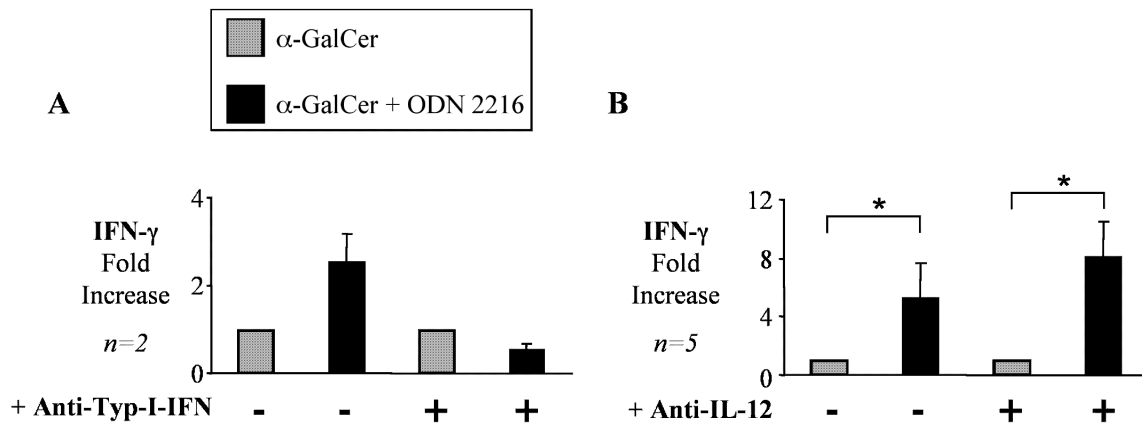
einem Verlust des CpG-Effekts auf die Ag-abhängige IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen (Abb. 8A). Folglich wird die CpG-induzierte Aktivierung von NKT-Zellen über PDC vermittelt.

Auf CpG-Stimulation hin produzieren PDC eine Reihe von Zytokinen und Chemokinen, insbesondere hohe Mengen an Typ-I-IFN (IFN- $\alpha/\beta$ ) (Krug, 2001a). Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass Typ-I-IFN NK-Zellen und Memory  $\alpha/\beta$  T-Zellen, wie  $\gamma/\delta$  T-Zellen, aktiviert (Rothenfusser, 2001). Daher stellte sich weiter die Frage, ob lösliche, von der PDC nach CpG-Stimulation sezernierte Faktoren die NKT-Zell-Aktivierung vermitteln. Um dies zu untersuchen, wurde ODN 2216-konditioniertes Medium (2216 CM), das die von PDC auf ODN 2216-Stimulation produzierten löslichen Faktoren enthält, hergestellt. In Gegenwart von  $\alpha$ -GalCer bewirkte die Stimulation mit 2216 CM eine ähnlich starke CD69-Aufregulation auf NKT-Zellen wie ODN 2216 selbst (Abb. 8B). Rekombinantes IFN- $\alpha$  erhöhte ebenfalls die  $\alpha$ -GalCer-abhängige CD69-Expression auf NKT-Zellen, jedoch etwas schwächer als 2216 CM.

Typ-I-IFN-blockierende Antikörper hemmten die CpG-induzierte, Ag-abhängige IFN- $\gamma$ -Expression in NKT-Zellen (Abb. 9A). Die Blockade von IL-12 hatte dagegen keinen Einfluss auf die CpG-induzierte,  $\alpha$ -GalCer-abhängige IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen (Abb. 9B).



**Abb. 8: PDC sind für die CpG-induzierte Aktivierung von NKT-Zellen verantwortlich. A:** Nach dem MACS-Prinzip wurden PDC zunächst aus PBMC positiv selektiert (s. Material und Methoden, S. 36); die PDC-depletierte PBMC-Fraktion sowie unveränderte PBMC desselben Spenders wurden weiterverwendet. Angereicherte NKT-Zellen wurden innerhalb normaler PBMC (PDC+) oder innerhalb PDC-depletierter PBMC (PDC-) mit  $\alpha$ -GalCer  $\pm$  ODN 2216 stimuliert. Nach zwei Tagen wurde IFN- $\gamma$  im Zellkulturüberstand über ELISA gemessen ( $n=5$ ). \* kennzeichnet ( $p<0,05$ ). **B :** Angereicherte NKT-Zellen in PBMC wurden mit  $\alpha$ -GalCer  $\pm$  ODN 2216 oder  $\pm$  von PDC nach ODN 2216-Stimulation produzierten löslichen Faktoren (2216 CM) oder  $\pm$  rekombinantes IFN- $\alpha$  stimuliert. Nach zwei Tagen wurde CD69 auf NKT-Zellen im Durchflusszytometer bestimmt ( $n=2$ ).

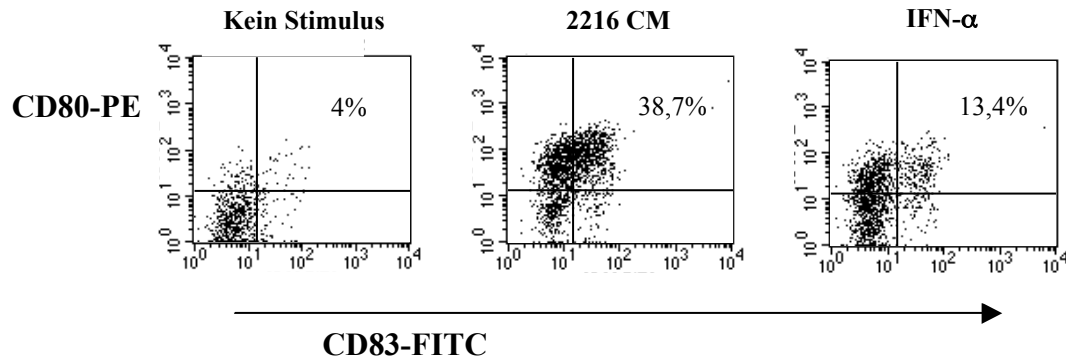


**Abb. 9: Die CpG-induzierte,  $\alpha$ -GalCer-abhängige NKT-Zell-Aktivierung ist abhängig von Typ-I-IFN, nicht von IL-12.** Angereicherte NKT-Zellen in PBMC wurden mit  $\alpha$ -GalCer  $\pm$  ODN 2216 stimuliert, jeweils in An- oder Abwesenheit blockierender Antikörper gegen (A) Typ-I-IFN (n=2) bzw. (B) IL-12 (n=5). Nach zwei Tagen wurde IFN- $\gamma$  im Kulturüberstand über ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Vielfaches (*Fold-Increase*) der Stimulation mit  $\alpha$ -GalCer ( $\alpha$ -GalCer=1). \* kennzeichnet (p<0,05).

Diese Ergebnisse belegen, dass die Wirkung von CpG-ODN auf die  $\alpha$ -GalCer-spezifischen NKT-Zellen zumindest teilweise über die von der PDC produzierten löslichen Faktoren vermittelt wird. Darüber hinaus wird damit deutlich, dass IFN- $\alpha/\beta$  ein essenzieller Faktor für die CpG-induzierte Aktivierung von NKT-Zellen ist.

Da MDC über die Präsentation von  $\alpha$ -GalCer eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von NKT-Zellen übernehmen, sollte auch der Einfluss CpG-induzierter Zytokine (2216 CM) auf MDC untersucht werden. Inkubation von isolierten MDC mit 2216 CM führte zu einer Aufregulation der Aktivierungsmarker CD80, CD86 und CD40 (CD86 und CD40 nicht abgebildet) und des Reifemarkers CD83 auf MDC (Abb. 10). Stimulation mit rekombinantem IFN- $\alpha$  zeigte ein ähnliches Ergebnis, jedoch etwas schwächer als bei 2216 CM. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass MDC in Gegenwart CpG-induzierter löslicher Faktoren verbesserte Antigen-präsentierende Fähigkeiten besitzen.

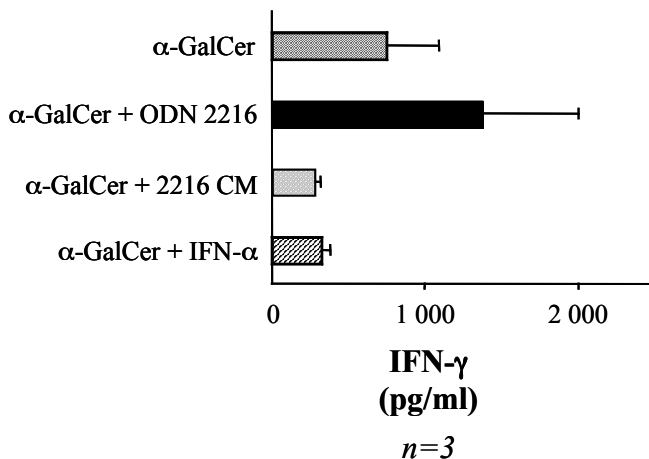
Die von PDC auf CpG-A-Stimulation produzierten löslichen Faktoren, insbesondere Typ-I-IFN, verstärken die  $\alpha$ -GalCer-spezifische NKT-Zellaktivierung demnach über zwei Wege: (i) *direkt* durch Aktivierung der NKT-Zellen; (ii) *indirekt* durch Aktivierung der MDC, die als Konsequenz verbesserte Antigen-präsentierende und kostimulatorische Fähigkeiten als APC gegenüber NKT-Zellen erlangt.



**Abb. 10:** Die nach CpG-Stimulation induzierten löslichen Faktoren bewirken eine Aktivierung und Ausreifung von MDC. MDC wurden nach dem MACS-Prinzip isoliert (s. Material und Methoden, S. 36). Isolierte MDC wurden mit den von PBMC nach ODN 2216-Stimulation produzierten löslichen Faktoren (2216 CM) oder mit rekombinatem IFN- $\alpha$  (5000 U/ml) stimuliert. Nach 13 Stunden wurde die Expression von CD80 und CD83 auf MDC im Durchflusszytometer bestimmt. Die prozentualen Anteile von CD80<sup>+</sup>/CD83<sup>+</sup> MDC eines repräsentativen Spenders (von  $n=3$ ) sind abgebildet.

### 3.4.3 Steigerung der Antigen-spezifischen IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen durch direkten Zell-zu-Zell-Kontakt zwischen NKT-Zellen und PDC

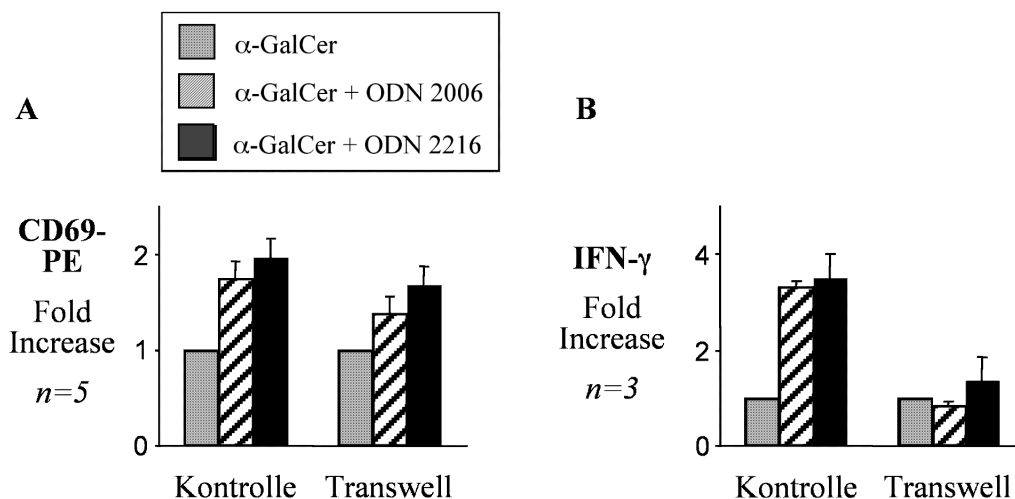
Die Depletion der PDC hatte gezeigt, dass PDC die CpG-induzierte Immunstimulation auf NKT-Zellen übertragen (Abb. 8A). CpG-induzierte, von der PDC produzierte lösliche Faktoren bewirkten die Aufregulation von CD69 auf NKT-Zellen (Abb. 8B). Erstaunlicherweise konnten jedoch weder CpG-induzierte lösliche Faktoren (2216 CM) noch rekombinantes IFN- $\alpha$  die Ag-abhängige IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen verstärken (Abb. 11). Dennoch muss das von PDC



**Abb. 11:** CpG-induzierte lösliche Faktoren sind nicht ausreichend, um die Antigen-abhängige IFN- $\gamma$  Produktion in NKT-Zellen zu verstärken. Angereicherte NKT-Zellen in PBMC wurden mit  $\alpha$ -GalCer  $\pm$  ODN 2216 oder  $\pm$  von PDC nach ODN 2216-Stimulation produzierten löslichen Faktoren (2216 CM) oder  $\pm$  rekombinatem IFN- $\alpha$  stimuliert. Nach zwei Tagen wurde IFN- $\gamma$  im Kulturüberstand über ELISA gemessen ( $n=3$ ).

produzierte IFN- $\alpha/\beta$  an der CpG-vermittelten Steigerung der IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen beteiligt sein, da Typ-I-IFN-blockierende Antikörper die IFN- $\gamma$ -Expression in NKT-Zellen bei CpG-Stimulation hemmten (Abb. 9A).

Folglich ist die CpG-induzierte, Ag-spezifische IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen abhängig von Typ-I-IFN, das von CpG-aktivierten PDC produziert wird. IFN- $\alpha$  und andere CpG-induzierte lösliche Faktoren reichen jedoch alleine nicht aus, um die IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen mit  $\alpha$ -GalCer synergistisch zu steigern. Offenbar wird neben löslichen Faktoren ein zusätzlicher Stimulus für die CpG-vermittelte Verstärkung der  $\alpha$ -GalCer-abhängigen IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen benötigt. Neben löslichen Faktoren könnte direkter Zell-zu-Zell-Kontakt mit der CpG-aktivierten PDC die Aktivierung der NKT-Zelle verstärken. Um dies näher zu untersuchen, wurden NKT-Zellen in einem Transwell-Kokultur-System innerhalb PDC-depletierter PBMC durch eine 0,2 $\mu$ m-Membran von PDC getrennt. Auf diese Weise war der Austausch löslicher Faktoren zwischen NKT-Zellen und PDC möglich, nicht jedoch ihr direkter Zell-zu-Zell-Kontakt. CpG-Stimulation steigerte in den Transwells - wie in den Kontroll-Wells - die Ag-abhängige CD69-Expression auf NKT-Zellen (Abb. 12A). Nur unter den Bedingungen, die einen Zellkontakt von PDC mit NKT-Zellen erlaubten (Kontroll-Wells), wurde dagegen eine Steigerung der  $\alpha$ -GalCer-abhängigen IFN- $\gamma$ -Induktion in NKT-Zellen durch CpG-Stimulation beobachtet, nicht in den Transwells (Abb. 12B).



**Abb. 12: Die CpG-induzierte,  $\alpha$ -GalCer-abhängige IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen setzt direkten Zell-zu-Zell-Kontakt zwischen NKT-Zellen und PDC voraus.** Nach dem MACS-Prinzip wurden PDC aus PBMC positiv selektiert (s. Material und Methoden, S. 36); isolierte PDC und PDC-depletierte PBMC-Fraktion wurden weiterverwendet. Angereicherte NKT-Zellen in PDC-depletierten PBMC wurden in die untere Kammer, isolierte PDC in die obere Kammer einer Transwell-Kulturplatte gegeben. Die beiden Kammern der Transwells waren durch eine 0,2 $\mu$ m-Membran voneinander getrennt. Die Zellen wurden mit  $\alpha$ -GalCer  $\pm$  CpG-ODN stimuliert. Als Kontrolle wurden alle Zellen zusammen ohne Membraneinsatz in demselben Volumen und mit denselben Stimuli inkubiert. Nach zwei Tagen wurde CD69 auf NKT-Zellen untersucht ((A),  $n=5$ ) und IFN- $\gamma$  im Kulturüberstand über ELISA gemessen ((B),  $n=3$ ). Die Ergebnisse sind dargestellt als Vielfaches (*Fold Increase*) der Stimulation mit  $\alpha$ -GalCer alleine ( $\alpha$ -GalCer = 1).

Diese Daten weisen darauf hin, dass die von der PDC nach CpG-Stimulation produzierten löslichen Faktoren die CD69-Expression auf NKT-Zellen Ag-abhängig verstärken; die CpG-vermittelte, Ag-abhängige IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen ist zwar abhängig von Typ-I-IFN, benötigt jedoch einen zusätzlichen Stimulus, der offenbar über direkten Zellkontakt zwischen NKT-Zellen und CpG-aktivierten PDC vermittelt wird.

## Teil II: Etablierung eines nicht-humanen Primatenmodells für präklinische Studien mit CpG-ODN

### 3.5 Detektion von Rhesus-Immunzellen aus dem peripheren Blut von Rhesusaffen

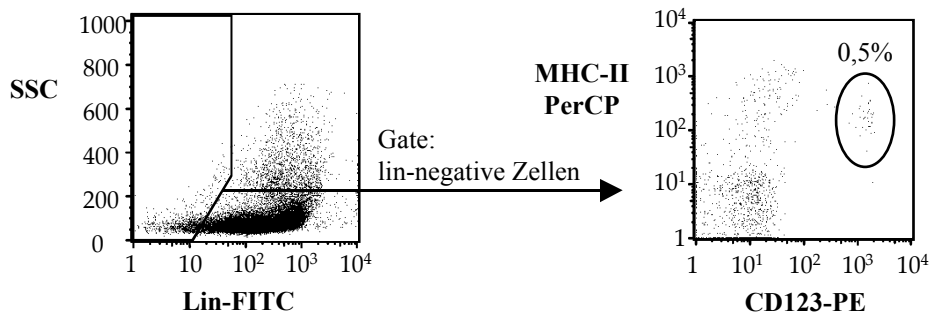
Die Erkennung von CpG-ODN ist speziesabhängig. Insbesondere die Unterschiede in der Verteilung von TLR9 in Maus und Mensch schränken die Übertragbarkeit der Daten aus murinen CpG-Studien auf das humane System stark ein (s. 1.7.5). Für die präklinische Untersuchung der immunstimulatorischen Aktivität sowie der Toxizität von CpG-ODN hat daher die Etablierung eines nicht-humanen Primatenmodells sehr hohe Bedeutung. In Zellkultur-Experimenten mit mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut von Rhesusaffen (Rhesus-PBMC) sollte zunächst untersucht werden, ob die beiden distinkten humanen CpG-Typen A und B *in vitro* jeweils dieselbe immunstimulierende Aktivität im Rhesusaffen besitzen wie im Menschen.

Für die Untersuchung der Aktivität von CpG-DNA im Rhesusaffen mussten zunächst folgende Methoden etabliert werden: (i) Isolation von Rhesus-PBMC aus 3-10 ml frischem peripheren Rhesus-Blut; (ii) Detektion verschiedener Populationen von Rhesus-Immunzellen durch Anfärbung im Durchflusszytometer; (iii) Detektion von Rhesus-Zytokinen über ELISA. Vor diesen Experimenten mussten die Expression der Oberflächenantigene auf Rhesus-Immunzellen untersucht und die Kreuzreaktivität humaner fluoreszenzmarkierter Antikörper und ELISA-Antikörper mit Rhesus-Oberflächenantigenen bzw. Rhesus-Zytokinen getestet werden (s. Material und Methoden). Im Hinblick auf die Aktivität von CpG-DNA im nicht-humanen Primaten interessierten besonders Existenz und Funktion der PDC in Rhesusaffen.

Die PBMC-Präparation aus peripherem Rhesusblut wurde dem Protokoll zur Generierung humaner PBMC weitgehend angeglichen. Die PBMC-Ausbeute aus 3-10 ml frischem Rhesusblut entsprach den Erfahrungswerten aus humanem Frischblut, nämlich mindestens 1 Millionen PBMC pro ml Blut. Morphologische Erscheinung (mikroskopische Betrachtung, Forward/Sideward-Scatter-Charakteristika im Durchflusszytometer), Oberflächenantigen-Expression und Frequenz aller untersuchter Populationen von Rhesus-Immunzellen entsprachen den Charakteristika der entsprechenden humanen Zellpopulationen. Spezifische Oberflächenantigen-Expression und Frequenz der untersuchten Rhesus-Immunzellen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Rhesus-PDC konnten anhand derselben Oberflächenantigene wie im humanen System nachgewiesen werden ( $\text{lin}^-/\text{HLADR}^+/\text{CD123}^+$ , Abb. 13). Ihr Anteil in PBMC (0,5%) entsprach in etwa der Frequenz humaner PDC im peripheren Blut. Wie in humanen PDC induzierte Stimulation mit CpG-ODN die



Expression kostimulatorischer und Antigen-präsentierender Moleküle auf Rhesus-PDC (nicht abgebildet).



**Abb. 13: Detektion von PDC im peripheren Rhesus-Blut.** Rhesus-PBMC wurden mit lin<sup>FITC</sup>, anti-HLADR<sup>PerCP</sup> und anti-CD123<sup>PE</sup> gefärbt. Der Prozentsatz von lin<sup>-</sup>/HLADR<sup>+</sup>/CD123<sup>+</sup> Rhesus-PDC wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Der Dot Plot zeigt die PDC-Färbung eines repräsentativen Rhesusaffen.

**Tab. 4: Oberflächenantigen-Expression und Frequenz von Rhesus-Immunzellen im peripheren Rhesus-Blut**

Immunzellen	Spezifische Oberflächenantigene	Frequenz in Rhesus-PBMC (%) ± SEM
Monozyten	CD14 <sup>+</sup> /HLADR <sup>+</sup>	5,8 ± 0,4 (n=8)
B-Zellen	CD20 <sup>+</sup> /HLADR <sup>+</sup>	13,9 ± 2,3 (n=8)
NK-Zellen	CD3 <sup>-</sup> /CD16 <sup>+</sup>	4,9 ± 0,5 (n=8)
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>	41,1 ± 2,1 (n=6)
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	20,3 ± 2 (n=8)
PDC	lin <sup>-</sup> /HLADR <sup>+</sup> /CD123 <sup>+</sup>	0,5 ± 0,1 (n=7)

### 3.6 Immunstimulatorische Aktivität von CpG-A und -B im nicht-humanen Primaten

Um die Aktivität humaner CpG-ODN in Rhesusaffen zu untersuchen, wurden Rhesus-PBMC in Gegenwart von CpG-A bzw. CpG-B zwei Tage lang kultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände zur Bestimmung von Zytokinen geerntet und die verschiedenen Rhesus-Immunzellen auf Expression von Aktivierungsmarkern untersucht.

#### 3.6.1 CpG-A: IFN- $\alpha$ -Induktion und Aktivierung von Monozyten

Zur Bestimmung von Rhesus-IFN- $\alpha$  in den Kulturüberständen von CpG-stimulierten Rhesus-PBMC wurde ein humaner IFN- $\alpha$ -ELISA verwendet, der etwa 20% Kreuzreaktivität mit Rhesus-IFN- $\alpha$  besitzt (Angabe der Firma PBL, Brunswick, USA). Das bedeutet, die detektierten IFN- $\alpha$ -

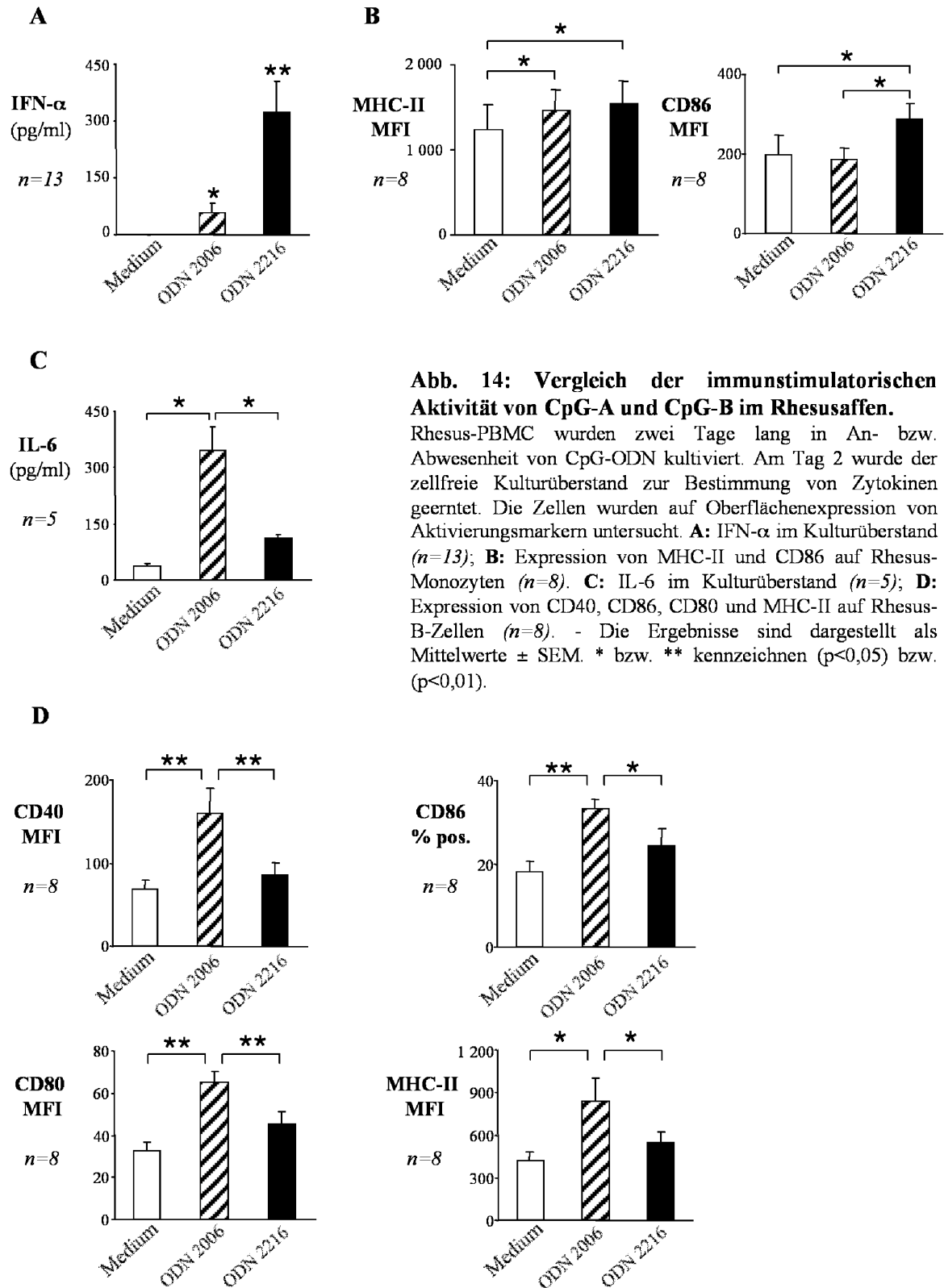
Werte repräsentieren höchstens ein Fünftel des in Wirklichkeit produzierten Rhesus-IFN- $\alpha$ . CpG-A ODN 2216 induzierte hohe Mengen an IFN- $\alpha$  innerhalb von Rhesus-PBMC, während CpG-B eine schwache, aber signifikante IFN- $\alpha$ -Produktion bewirkte (Abb. 14A).

Humane Monozyten exprimieren kein TLR9 und reagieren als isolierte Zellpopulation nicht auf CpG-Stimulation. Innerhalb von PBMC werden humane Monozyten durch CpG-Stimulation sekundär - über IFN- $\alpha$  produziert von PDC - aktiviert, was sich anhand der Expression von Aktivierungsmarkern und Antigen-präsentierender Moleküle auf ihrer Oberfläche nachweisen lässt. Beide CpG-Typen induzierten auf Rhesus-Monozyten eine signifikante Aufregulation des antigen-präsentierenden Moleküls MHC-II (Abb. 14B). Nur CpG-A führte zu einer verstärkten Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf Rhesus-Monozyten.

### 3.6.2 CpG-B: Präferentielle Aktivierung von Rhesus-B-Zellen

CpG-B bewirkt eine starke B-Zell-Aktivierung im humanen System, gekennzeichnet durch die Aufregulation kostimulatorischer Moleküle auf der Zelloberfläche sowie die Produktion hoher Mengen an IL-6. Übereinstimmend mit den Erkenntnissen aus dem humanen System wurden in Kulturüberständen von CpG-stimulierten Rhesus-PBMC hohe Mengen an IL-6 nach Stimulation mit CpG-B (ODN 2006) detektiert, während CpG-A (ODN 2216) nur sehr wenig IL-6 induzierte (Abb. 14C). Die Untersuchung von Aktivierungsmarkern (CD40, CD80, CD86) und dem Antigen-präsentierenden Molekül MHC-II auf B-Zellen zeigte, dass CpG-B B-Zellen in Rhesusaffen sehr stark aktiviert, deutlich stärker als CpG-A, welches die Oberflächenmarker auf B-Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle nur gering nach oben modulierte (Abb. 14D).

Aus den Zellkultur-Experimenten mit Rhesus-PBMC geht hervor, dass die beiden distinkten humanen CpG-Typen jeweils eine vergleichbare immunstimulatorische Aktivität im Rhesusaffen wie im Menschen besitzen, die sich anhand der im humanen System etablierten Nachweismethoden untersuchen lässt: CpG-A zeichnet sich in erster Linie durch eine starke IFN- $\alpha$ -Induktion in PDC aus, wodurch sekundär andere Immunzellen, wie Monozyten, aktiviert werden; CpG-B induziert nur wenig IFN- $\alpha$  und aktiviert vor allem B-Zellen zur Aufregulation von kostimulatorischen Molekülen und zur Produktion von IL-6. Der Rhesusaffe ist somit offenbar ein ausgezeichnetes Primatenmodell für präklinische Studien mit CpG-ODN. Die Austestung der CpG-Wirkung im Rhesusaffen wird einerseits tierexperimentelle Daten hervorbringen, die besser auf das humane System übertragbar sind und erlaubt andererseits die Untersuchung von Krankheiten innerhalb der Primaten-Spezies (z.B. HIV), für die es keine geeigneten Mausmodelle gibt.



**Abb. 14: Vergleich der immunstimulatorischen Aktivität von CpG-A und CpG-B im Rhesusaffen.**

Rhesus-PBMC wurden zwei Tage lang in An- bzw. Abwesenheit von CpG-ODN kultiviert. Am Tag 2 wurde der zellfreie Kulturüberstand zur Bestimmung von Zytokinen geerntet. Die Zellen wurden auf Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern untersucht. **A:** IFN- $\alpha$  im Kulturüberstand (n=13); **B:** Expression von MHC-II und CD86 auf Rhesus-Monozyten (n=8). **C:** IL-6 im Kulturüberstand (n=5); **D:** Expression von CD40, CD86, CD80 und MHC-II auf Rhesus-B-Zellen (n=8). - Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* bzw. \*\* kennzeichnen ( $p < 0,05$ ) bzw. ( $p < 0,01$ ).

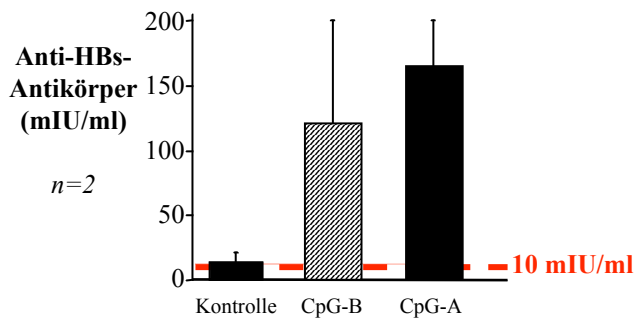
### 3.7 *In vivo*-Untersuchung der Adjuvans-Eigenschaften von CpG-A und CpG-B bei einer Hepatitis B-Vakzinierung im Rhesusaffen

In früheren Vakzinierungsstudien mit Affen wurde bereits beschrieben, dass CpG-B ODN 2006 als potentes Adjuvans in der Lage ist, die Bildung einer spezifischen humoralen Immunantwort in Primaten zu verstärken (Davis, 2000; Hartmann, 2000). Zu Beginn dieser Arbeit gab es jedoch noch keine Studie, in der die Adjuvans-Aktivitäten der beiden humanen CpG-Typen A (ODN 2216) und -B (ODN 2006) in Primaten miteinander verglichen wurden.

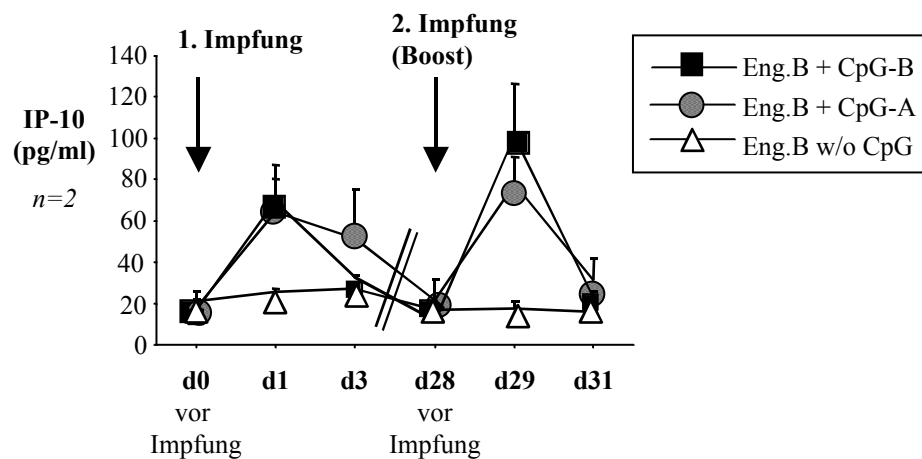
In Kooperation mit dem Deutschen Primatenzentrum (DPZ) in Göttingen wurde eine Vakzinierungsstudie mit Rhesusaffen durchgeführt, in der die Adjuvans-Aktivitäten von CpG-A und CpG-B bei einer Hepatitis B-Vakzinierung erstmals miteinander verglichen wurden. Die Kontrollgruppe erhielt nur den Engerix B-Impfstoff (10 µg Eng.B w/o ODN). Die anderen beiden Gruppen wurden mit Engerix B (10 µg) plus jeweils 250 µg CpG-B bzw. CpG-A geimpft. Die Affen wurden im Abstand von vier Wochen zweimal geimpft (d0 + d28). Jede Gruppe setzte sich aus zwei Versuchstieren zusammen ( $n=2$  pro Gruppe). Zur Überprüfung des Impferfolges wurden die Antikörpertiter gegen das Hepatitis B-Oberflächenantigen (anti-HBs-AK-Titer) im Plasma der geimpften Tiere bestimmt. Ein anti-HBs-Titer  $>10$  mIU/ml im Plasma von Primaten korreliert mit einer Seroprotektion gegenüber einer HBV-Infektion (Hadler, 1986; Davis, 2000).

Vier Wochen nach der ersten Impfung waren die anti-HBs-AK-Titer im Plasma der Tiere in den CpG-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht (10- bis 20-fach höhere Titer in den CpG-Gruppen als in der Kontrollgruppe; Abb. 15A) und lagen weit über dem protektiven Antikörpertiter von 10 mIU/ml. Die AK-Titer in der Kontrollgruppe erreichten dagegen in Woche 4 nicht die Höhe protektiver Titer. Im Durchschnitt lagen die AK-Titer der beiden Tiere aus der CpG-A-Gruppe in Woche 4 etwas höher als die der CpG-B-Gruppe, wobei jedoch nur eines der beiden Tiere der CpG-B-Gruppe eine schwächere AK-Antwort als die CpG-A-Tiere zeigte (Einzeltierdaten nicht abgebildet). Studien mit höheren Fallzahlen als  $n=2$  müssen folgen, um eine mögliche Überlegenheit von CpG-A gegenüber CpG-B in der Induktion einer spezifischen humoralen Immunantwort zu belegen. Nach der zweiten Impfung waren die Antikörpertiter in allen Gruppen stark erhöht (anti-HBs-AK-Titer Woche 6 (mIU/ml): CpG-A-Gruppe:  $625 \pm 287$ ; CpG-B-Gruppe:  $3626 \pm 3384$ ; Kontroll-Gruppe:  $2831 \pm 2193$  [Mittelwerte  $\pm$  Streubereich]). Der hohe Streubereich weist darauf hin, dass die AK-Titer innerhalb einer Gruppe stark schwankten. CpG-ODN wurden gut vertragen, es wurden keine Toxizität und Nebenwirkungen beobachtet.

A



B



**Abb. 15: Beide CpG-Typen verstärken die Effektivität einer Hepatitis B-Vakzine.**

**A:** Vier Wochen nach der ersten Hepatitis B-Vakzinierung wurden anti-HBs-Antikörper-Titer im Plasma der geimpften Affen bestimmt. Die Titer sind angegeben als Milliinternationale Einheiten pro ml (mIU/ml). Protektive anti-HBs-Antikörper-Titer liegen bei  $\geq 10$  mIU/ml. **B:** Jeweils vor den beiden Impfungen (d0+d28) sowie an den angegebenen Zeitpunkten wurde IP-10 im Plasma der geimpften Affen im ELISA bestimmt ( $n=2$  Affen pro Gruppe). - Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Streubereich [range].

Um den immunpotenzierenden Effekt von CpG-DNA in Form eines klinischen Monitorings *in vivo* verfolgen zu können, wurde ein Plasma-Parameter gesucht, der während einer CpG-Behandlung mit der Immunstimulation durch CpG-DNA korreliert. Den Affen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten Blut abgenommen (d0 vor Impfung, d1, d3, d28 vor Boost, d29, d31) und daraus durch Zentrifugation das Plasma gewonnen. Die Plasmaproben der geimpften Affen wurden zunächst auf IFN- $\alpha$  untersucht. Weder bei der CpG-Gruppe noch bei der Kontrollgruppe war im Plasma zu den

angegebenen Zeitpunkten IFN- $\alpha$  nachweisbar (Daten nicht abgebildet). Aus *in vitro*-Versuchen ist bekannt, dass CpG-ODN über IFN- $\alpha$  das Chemokin IP-10 induzieren (Blackwell, 2003), das CXCR3-exprimierende, aktivierte T-Zellen anlockt. Daher wurde das Plasma der geimpften Tiere anschließend auf IP-10 untersucht. Beide CpG-Typen führten zu einem schnellen, etwa gleich starken Anstieg des Plasma-IP-10 (Abb. 15B). Im Gegensatz dazu blieb das Plasma-IP-10 in den Kontroll-Tieren konstant niedrig. Die IP-10-Werte im Plasma der CpG-geimpften Tiere waren jeweils an den Tagen nach den beiden Impfungen (d1 und d29) maximal erhöht und fielen bereits in den folgenden zwei Tagen wieder auf die Ausgangswerte zurück (d3 bzw. d31). Nach der zweiten Impfung lagen die Plasma-IP-10-Werte bei den CpG-geimpften Tieren noch etwas höher als nach der ersten Vakzinierung, aufgrund der niedrigen Fallzahl war dieser Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant. Die höheren IP-10-Werte nach der zweiten Impfung beruhen möglicherweise auf einer Voraktivierung der Zellen.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sowohl CpG-B als auch CpG-A im Primaten potente Adjuvans-Eigenschaften besitzen, da sie die Bildung spezifischer Antikörper auf ein Immunogen verstärken. Die systemische Wirksamkeit einer intramuskulären CpG-Behandlung lässt sich durch den Anstieg des Plasma-IP-10 belegen. In einer eigenen vorausgegangenen Studie, in der Affen Tetanustoxoid plus CpG-ODN mukosal auf die Tonsille appliziert worden war, entwickelten die Affen keine spezifische humorale Immunität gegen Tetanustoxoid. In Korrelation dazu wurde kein Anstieg des Plasma-IP-10 gemessen. Offenbar bewirkte die tonsilläre CpG-Applikation keine systemische Immunstimulation (eigene Daten, Manuskript in Vorbereitung). Die Bestimmung des Plasma-IP-10 nach CpG-Behandlung ist somit offenbar gut geeignet, die systemische Immunstimulation durch CpG-ODN im Rahmen eines klinischen Monitorings zu überprüfen. Darüber hinaus könnte man die IP-10-Bestimmung nach CpG-Gabe möglicherweise für Dosis- bzw. Toxizitätstest verwenden.

### **3.8 Hemmung der Wirkung von CpG-ODN durch humane Blutbestandteile**

In den bisher dargestellten *in vitro*-Experimenten wurde die immunstimulatorische Wirkung von CpG-ODN ausschließlich innerhalb von humanen oder Rhesus-PBMC untersucht. In den Plasmaproben der CpG-geimpften Affen war kein IFN- $\alpha$  nachweisbar. Es ist nicht bekannt, ob die *in vivo*-Aktivität von CpG-ODN im Blut (nach intravenöser Gabe) der *in vitro*-Aktivität entspricht. Um eine intravenöse Applikation von CpG-ODN *in vitro* zu simulieren, sollte untersucht werden, ob die immunstimulatorische Wirkung von CpG-ODN auch in Vollblut über Zytokine bzw. Chemokine nachweisbar ist. Dazu wurde humanes Spenderblut zwei Tage lang in Anwesenheit von CpG-ODN *in vitro* kultiviert. Als Kontrolle wurden von jedem Spender PBMC isoliert und zwei Tage lang in RPMI-Vollmedium mit CpG-ODN inkubiert. PBMC wurden in einer Konzentration von 1 Mio/ml in Kultur gegeben. Das entspricht erfahrungsgemäß der PBMC-Konzentration in

Vollblut. Nach zwei Tagen wurden die Zellen abzentrifugiert und der zellfreie Überstand auf IFN- $\alpha$  und IP-10 untersucht.

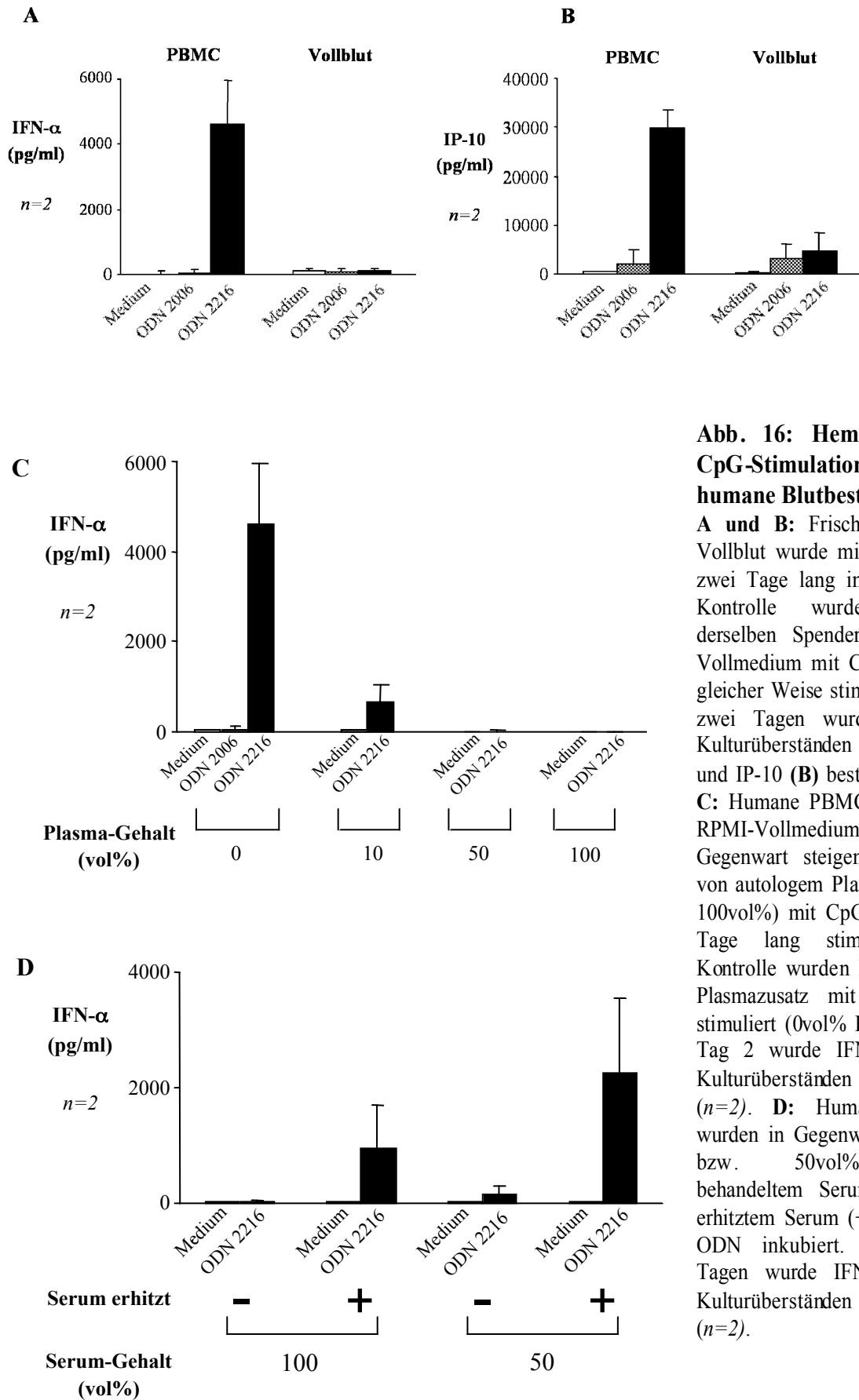
Wie erwartet, induzierte die Stimulation mit CpG-A in PBMC sehr hohe Mengen an IFN- $\alpha$ , während CpG-B kaum IFN- $\alpha$  induzierte (Abb. 16A). In Vollblut war dagegen nach Stimulation mit CpG-A kein IFN- $\alpha$  messbar (Abb. 16A). CpG-A und CpG-B induzierten innerhalb von PBMC sehr hohe Mengen an IP-10, wobei CpG-A noch eine sehr viel höhere IP-10-Produktion bewirkte als CpG-B (CpG-B:  $2116 \pm 413$  pg/ml; CpG-A:  $29821 \pm 12606$  pg/ml;  $n=2$ ; Abb. 16B). In Vollblut induzierte CpG-B im selben Größenbereich IP-10 wie in PBMC, während CpG-A sehr viel weniger IP-10 induzierte als in PBMC (CpG-B:  $3257 \pm 2901$  pg/ml; CpG-A:  $4783 \pm 3765$  pg/ml;  $n=2$ ). Dennoch konnte die immunstimulatorische Wirkung beider CpG-Typen über IP-10 auch im Vollblut sehr gut nachgewiesen werden.

Offenbar inhibieren bestimmte Blutbestandteile die IFN- $\alpha$ - und IP-10-Produktion bei CpG-Stimulation in Vollblut. Besonders stark wirkt sich das auf IFN- $\alpha$  aus, das in Vollblut nach CpG-Stimulation gar nicht mehr nachweisbar ist. Um den inhibierenden Effekt von Blutbestandteilen auf die IFN- $\alpha$ -Produktion näher zu untersuchen, wurden PBMC mit ansteigenden Zusätzen von autologem Plasma in Anwesenheit von CpG-ODN inkubiert. Als Kontrolle dienten erneut PBMC jeweils derselben Spender in RPMI-Vollmedium ohne Plasmazusatz. In Anwesenheit von 10% Plasma war die IFN- $\alpha$ -Produktion bereits sehr stark reduziert (Abb. 16C). Plasma-Anteile von 50 und 100% inhibierten die IFN- $\alpha$ -Produktion vollständig. Ansteigende Zusätze von Serum inhibierten ebenfalls die IFN- $\alpha$ -Produktion von PBMC nach CpG-Gabe (Daten nicht abgebildet).

Die inhibierende Wirkung von - offenbar löslichen - Blutbestandteilen auf die IFN- $\alpha$ -Produktion von PBMC sollte weiter untersucht werden. Man kann spekulieren, dass bestimmte Enzyme, die die Oligonukleotide und/oder die induzierten Zytokine sehr rasch abbauen, für die verringerte IFN- $\alpha$ -Produktion im Blut verantwortlich sind. Um die Einflüsse von hitzelabilen Proteinen im Serum auf die IFN- $\alpha$ -Produktion zu untersuchen, wurde das Serum zunächst erhitzt (1h, 56 °C), bevor es in Anteilen von 100 bzw. 50vol% zusammen mit PBMC und CpG-A in Kultur gegeben wurde. Zum Vergleich wurde von jedem Spender nicht erhitztes Serum unter denselben Bedingungen angesetzt. Während in Anwesenheit von 100vol% nicht-behandeltem Serum kein IFN- $\alpha$  messbar war (Abb. 16D), konnte in Anwesenheit von 100vol% erhitztem Serum IFN- $\alpha$  nachgewiesen werden. Noch deutlicher war dieser Effekt, wenn PBMC mit nur 50vol% Serum inkubiert waren: Die IFN- $\alpha$ -Produktion von PBMC in Gegenwart von 50vol% erhitztem Serum erreichte annähernd den Größenbereich, den man in PBMC ohne Serumzusatz innerhalb von RPMI-Vollmedium erwartet. In Gegenwart von 50vol% unbehandeltem Serum war dagegen kaum IFN- $\alpha$  messbar.

Diese ersten Versuche bezüglich der Aktivität von CpG-ODN in Vollblut bzw. in Gegenwart von Plasma bzw. Serum weisen darauf hin, dass eine intravenöse CpG-Gabe ganz entscheidend durch physiologische Faktoren beeinflusst und eventuell beeinträchtigt werden kann. Darüber hinaus lassen diese Daten annehmen, dass hitzelabile Enzyme die IFN- $\alpha$ -Produktion im Blut verhindern.





**Abb. 16: Hemmung der CpG-Stimulation durch humane Blutbestandteile.**

**A und B:** Frisches humanes Vollblut wurde mit CpG-ODN zwei Tage lang inkubiert. Als Kontrolle wurden PBMC derselben Spender in RPMI-Vollmedium mit CpG-ODN in gleicher Weise stimuliert. Nach zwei Tagen wurden in den Kulturüberständen IFN- $\alpha$  (**A**) und IP-10 (**B**) bestimmt ( $n=2$ ). **C:** Humane PBMC wurden in RPMI-Vollmedium in Gegenwart steigender Anteile von autologem Plasma (10, 50, 100vol%) mit CpG-ODN zwei Tage lang stimuliert. Als Kontrolle wurden PBMC ohne Plasmasatz mit CpG-ODN stimuliert (0vol% Plasma). Am Tag 2 wurde IFN- $\alpha$  in den Kulturüberständen gemessen ( $n=2$ ). **D:** Humane PBMC wurden in Gegenwart von 100 bzw. 50vol% nicht-behandeltem Serum (-) bzw. erhitztem Serum (+) mit CpG-ODN inkubiert. Nach zwei Tagen wurde IFN- $\alpha$  in den Kulturüberständen bestimmt ( $n=2$ ).

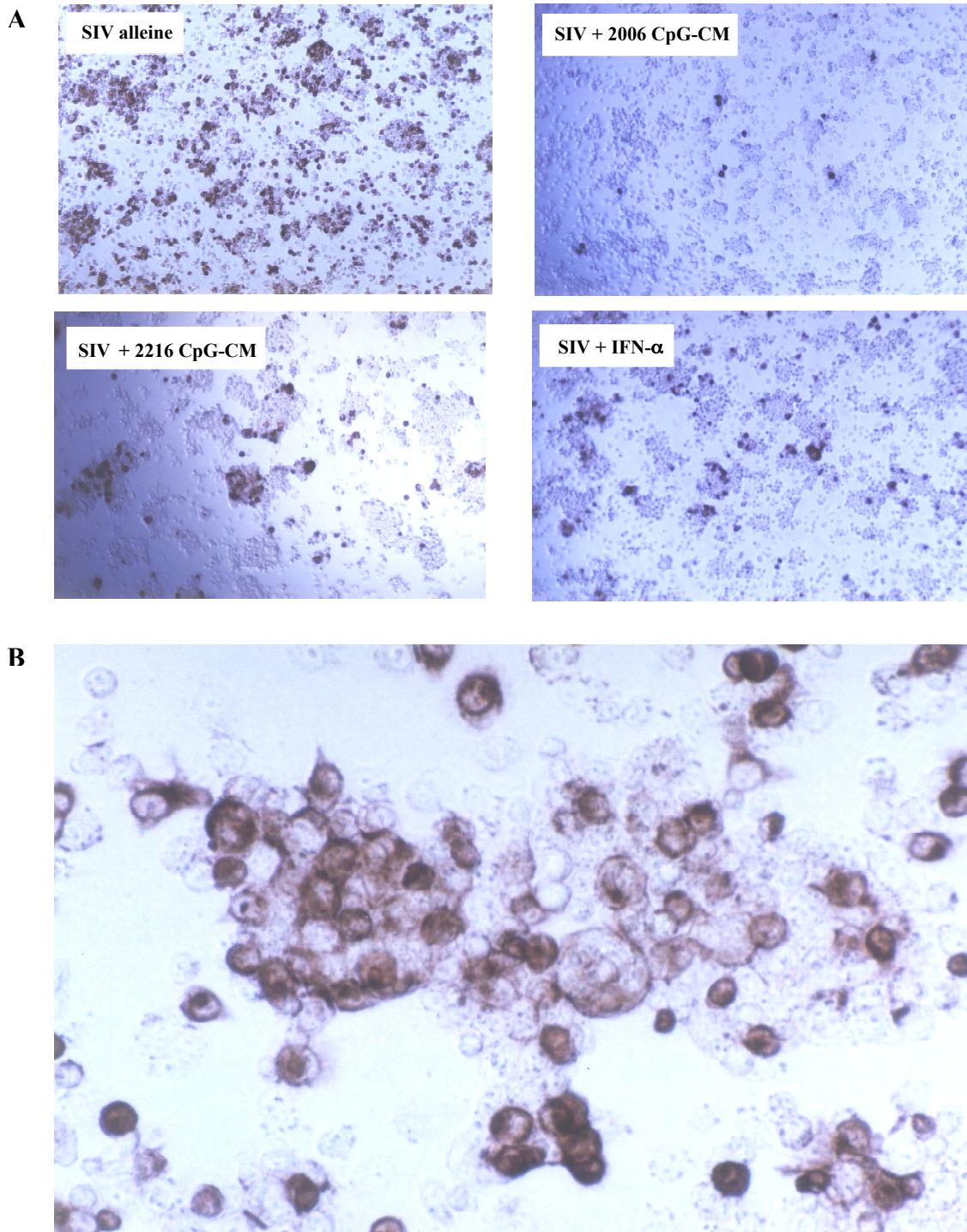
### 3.9 Untersuchung der antiviralen Aktivität von CpG-induzierten löslichen Faktoren gegenüber *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV)

Bei Virusinfektion oder Stimulation mit CpG-DNA produzieren PDC hohe Mengen an Zytokinen und Chemokinen, insbesondere die antiviral wirksamen Typ-I-Interferone (Chehimi, 1989; Fitzgerald-Bocarsly, 1993). In der Literatur gibt es Hinweise, dass IFN- $\alpha$  die Replikation von HIV bzw. SIV, einem HIV-Modell im Rhesusaffen, *in vitro* (Agy, 1995) und die Replikation von HIV *in vivo* (Mildvan, 1996; Lapenta, 1999; Haas, 2000; Emilie, 2001; Hatzakis, 2001) inhibiert.

Basierend auf diesen Daten sollten in Zellkultur-Experimenten mit einer SIV-permissiven CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie, SIV und Kulturüberständen von CpG-stimulierten Rhesus-PBMC folgende Fragen beantwortet werden: 1) Können Kulturüberstände von Rhesus-PBMC nach CpG-Stimulation (=CpG-induzierte lösliche Faktoren) eine SIV-permissive humane CD4<sup>+</sup> T-Zell-Linie vor einer Infektion mit SIV schützen? 2) Hat CpG-A aufgrund seiner starken Typ-I-IFN-Induktion stärkere antivirale Eigenschaften als CpG-B? 3) Zeigt rekombinantes IFN- $\alpha$  eine vergleichbare antivirale Aktivität wie CpG-DNA?

Eine SIV-permissive, humane CD4<sup>+</sup> T-Zell-Linie (C8166) wurde nur mit dem Retrovirus SIV (Virusstamm: SIVmac239), oder mit SIV plus Rhesus-Kulturüberständen von CpG-A- bzw. CpG-B-stimulierten Rhesus-PBMC (=CpG-conditioned medium; CpG-CM), oder mit SIV plus rekombinantes humanen IFN- $\alpha$  kultiviert. Nach einer Woche wurden die T-Zellen geerntet und auf einer Well-Platte fixiert, anschließend ihre Zellwand permeabilisiert und SIV intrazellulär durch Anfärbung nachgewiesen (genaue Beschreibung der Methode, s. 2.8). Virus-infizierte Zellen wurden im Lichtmikroskop als dunkel-violett identifiziert, nicht infizierte Zellen als ungefärbt und hell.

Die Abbildungen in 17A zeigen die T-Zellen bei allen Versuchsbedingungen nach Inkubation mit SIV (Virustiter 10<sup>4</sup> Mio/ml). T-Zellen, die eine Woche lang nur mit dem Virus inkubiert wurden (SIV alleine), waren fast ausnahmslos violett gefärbt, also SIV-infiziert (Abb. 17A, links oben). Typische Synzytium-Formationen von virusinfizierten T-Zellen waren bei stärkerer Vergrößerung erkennbar (Abb. 17B). T-Zellen, die mit SIV in Anwesenheit von 2216 CpG-CM kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine deutlich verminderte Anzahl an virusinfizierten T-Zellen (Abb. 17A, links unten). Die Inkubation mit SIV und rekombinantes IFN- $\alpha$  reduzierte ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle die Infektion der T-Zellen mit SIV (Abb. 17A, rechts unten). Die antivirale Aktivität von IFN- $\alpha$  war vergleichbar mit der von 2216 CpG-CM. Überraschenderweise zeigte 2006 CpG-CM die höchste antivirale Aktivität (Abb. 17A, rechts oben), deutlich stärker noch als 2216 CpG-CM und rekombinantes IFN- $\alpha$ .



**Abb. 17: Untersuchung der antiviralen Aktivität von CpG-induzierten löslichen Faktoren in einem SIV-Assay. (A)** Eine SIV-permissive T-Zelllinie wurde mit SIV alleine, SIV plus 2216 CpG-CM, SIV plus rekombinatem IFN- $\alpha$  bzw. SIV plus 2006 CpG-CM sieben Tage lang kultiviert. Der Virustiter betrug bei den abgebildeten Bedingungen  $10^4$  Mio/ml. Nach einer Woche wurden die SIV-infizierten T-Zellen angefärbt und der Anteil SIV-infizierter T-Zellen durch Auswertung im Lichtmikroskop in 10-facher ( $\times 10$ ) Vergrößerung untersucht. SIV-infizierte T-Zellen sind dunkelviolett bis bräunlich gefärbt; nicht infizierte T-Zellen sind ungefärbt und hell. **(B)** Typische Synzytium-Formationen virus-infizierter T-Zellen. SIV alleine in 40-facher ( $\times 40$ ) Vergrößerung im Lichtmikroskop aufgenommen.

Um die antivirale Wirkung einer Behandlung quantitativ erfassen zu können, wurde die Methode von Reed & Muench (Reed, 1938) angewendet. Mithilfe dieser lässt sich für jede Behandlung der Virustiter berechnen, ab dem eine Infektion der T-Zellen erfolgt (s. 2.8). Je effektiver eine Behandlung SIV hemmen kann, desto höhere Virustiter sind erforderlich, um eine T-Zelle zu infizieren. Die quantitative Auswertung ergab, dass der Virus ohne Behandlung bereits bei einem Titer von  $10^{-6,3}$  Mio/ml infektiös war. In Gegenwart von CpG-CM bzw. rekombinatem IFN- $\alpha$  wurde der Virustiter, ab dem T-Zellen infiziert wurden, in höhere Bereiche verschoben (2216 CpG-CM:  $10^{-5,7}$  Mio/ml; IFN- $\alpha$ :  $10^{-5,6}$  Mio/ml; 2006 CpG-CM:  $10^{-3,7}$  Mio/ml). Die quantitative Auswertung verdeutlicht die Überlegenheit von 2006 CpG-CM in der SIV-Inhibition.

Aus diesen Daten geht hervor, dass sowohl CpG-Kulturüberstände von Rhesuszellen als auch rekombinantes IFN- $\alpha$  die Infektion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit SIV hemmen. CpG-B-Kulturüberstände konnten T-Zellen besonders effektiv vor einer SIV-Infektion schützen. Möglicherweise inhibieren CpG-A und CpG-B über verschiedene Mechanismen die Infektion der T-Zellen mit SIV: CpG-A primär über seine hohe IFN- $\alpha$ -Induktion, CpG-B eventuell über andere lösliche Komponenten, die bisher noch nicht bekannt sind.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde

#### *Stimulation humaner NKT-Zellen mit CpG-ODN und $\alpha$ -GalCer*

PBMC aus dem peripheren Blut gesunder Spender enthalten durchschnittlich 0,2% CD3<sup>+</sup>/V $\alpha$ 24<sup>+</sup>/V $\beta$ 11<sup>+</sup> NKT-Zellen. Um humane NKT-Zellen isoliert zu untersuchen, wurde eine MACS-basierte Methode entwickelt, die es ermöglichte, NKT-Zellen aus dem peripheren Blut aufzureinigen. Eine Analyse der Expression der Toll-like Rezeptoren 1-10 in NKT-Zellen zeigte ein ähnliches TLR-Expressionsmuster wie in NK-Zellen und T-Zellen mit einer geringen bis fehlenden Expression von TLR9, dem Rezeptor für CpG-ODN. Dementsprechend wiesen aufgereinigte NKT-Zellen keine Sensitivität gegenüber CpG-ODN auf. Im Gegensatz zur fehlenden Wirkung auf isolierte NKT-Zellen induzierten CpG-ODN in Mischzellkulturen von PBMC und angereicherten NKT-Zellen eine Teilaktivierung von NKT-Zellen (CD69, IFN- $\gamma$ ). Kostimulation mit dem spezifischen Glykolipid-Antigen  $\alpha$ -GalCer und CpG-ODN verstärkte synergistisch die Antigen-spezifische CD69-Expression und IFN- $\gamma$ -Synthese in NKT-Zellen im Vergleich zu  $\alpha$ -GalCer alleine. Der Typ-I-IFN induzierende ODN-Typ CpG-A zeigte einen stärker aktivierenden Effekt auf NKT-Zellen als CpG-B.

B-Zellen und PDC sind die einzigen Zellen in humanen PBMC, die TLR9 exprimieren und somit CpG-ODN direkt erkennen. NKT-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen  $\alpha$ -GalCer nur, wenn es ihnen von APC im Kontext von CD1d präsentiert wird. Zunächst wurde vermutet, dass die CpG-Zielzellen B-Zellen oder PDC CD1d tragen und somit dieselbe Zelle in der Lage ist, NKT-Zellen das Antigen  $\alpha$ -GalCer über CD1d zu präsentieren und durch Erkennung von CpG-ODN die Antigen-spezifische Aktivierung der NKT-Zellen zu verstärken. Die Analyse der CD1d-Expression zeigte jedoch, dass in PBMC weder PDC noch B-Zellen oder Monozyten, sondern ausschließlich myeloide DC CD1d exprimieren. In funktionellen Studien wurde bestätigt, dass die  $\alpha$ -GalCer-induzierte Aktivierung von NKT-Zellen von der Anwesenheit CD1d-tragender MDC abhängig ist.

Die CpG-vermittelte Wirkung auf NKT-Zellen wurde aufgehoben, wenn PDC aus einer Kokultur von NKT-Zellen und PBMC depletiert wurden. Die CpG-ODN erkennende Zelle (PDC) und die  $\alpha$ -GalCer präsentierende Zelle (MDC) sind somit nicht identisch. Bisherige Arbeiten, die die sekundäre Aktivierung anderer Immunzellen durch CpG-aktivierte PDC beschreiben, ließen annehmen, dass MDC oder NKT-Zellen über die von CpG-stimulierten PDC sezernierten löslichen

Faktoren aktiviert werden und dadurch die Antigen-spezifische Aktivierung von NKT-Zellen CpG-vermittelt gesteigert wird. In der Tat bewirkten CpG-induzierte lösliche Faktoren (Überstand von CpG-stimulierten PDC) eine Aufregulation von CD69 auf NKT-Zellen und eine Expression kostimulatorischer Moleküle auf MDC. Experimente mit blockierenden Antikörpern zeigten, dass die CpG-vermittelte Verstärkung der Antigen-spezifischen IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen Typ-I-IFN-abhängig ist. CpG-induzierte lösliche Faktoren alleine reichten jedoch nicht aus, um die Ag-spezifische IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen CpG-vermittelt zu steigern. Daher wurde vermutet, dass neben löslichen Faktoren direkter Zellkontakt zwischen NKT-Zellen und PDC für die Induktion von IFN- $\gamma$  in NKT-Zellen durch die CpG-stimulierte PDC notwendig ist. Dies konnte schließlich in Transwell-Versuchen funktionell bestätigt werden.

Obwohl PDC also kein CD1d für die Präsentation des spezifischen Antigens  $\alpha$ -GalCer exprimieren, führt ein direkter Zellkontakt zwischen CpG-stimulierter PDC und NKT-Zelle im Zusammenspiel mit Typ-I-IFN zu einer verstärkten IFN- $\gamma$ -Synthese in NKT-Zellen. Diese Ergebnisse belegen, dass die PDC in der Lage ist, Ag-unabhängig die Effektorfunktion von NKT-Zellen über direkte und indirekte Mechanismen zu steuern.

#### *Untersuchung der immunstimulatorischen Wirkung von CpG-A und CpG-B in einem nicht-humanen Primatenmodell*

In einem nicht-humanen Primatenmodell, dem Rhesusaffen, zeigten die beiden distinkten humanen CpG-Typen eine vergleichbare Aktivität wie im Menschen: CpG-A induzierte hohe Mengen an IFN- $\alpha$  und aktivierte Monozyten; CpG-B zeigte eine wesentlich schwächere IFN- $\alpha$ -Induktion, dafür jedoch eine sehr starke B-Zellaktivierung.

Beide CpG-Typen, A und B, verstärkten *in vivo* im Rhesusaffen die Effektivität einer Hepatitis B-Vakzine. Bereits nach einer Vakzinierung lagen die Antikörpertiter der mit Engerix B plus CpG ODN-geimpften Affen weit über dem protektiven Titerbereich (>10 mIU/ml). Im Gegensatz dazu wurde bei der Kontrollgruppe (Engerix B w/o ODN) nach einer Impfung kein seroprotektiver Antikörpertiter erreicht. Als Zeichen der systemischen Immunaktivierung durch CpG-ODN wurde im Plasma der Affen beider CpG-Gruppen jeweils unmittelbar nach den beiden Impfungen ein Anstieg des inflammatorischen Chemokins IP-10 nachgewiesen. In der Kontrollgruppe wurde dagegen kein Anstieg des Plasma-IP-10 nach den Impfungen beobachtet.

IFN- $\alpha$  konnte weder im Plasma der CpG-geimpften Affen noch in Vollblut-Assays nach CpG-Stimulation *in vitro* nachgewiesen werden. Die Produktion des Chemokins IP-10 war *in vitro* nach CpG-Stimulation in Vollblut - im Vergleich zu RPMI-Kulturmedium - deutlich vermindert, jedoch im Gegensatz zu Typ-I-IFN nach Stimulation mit beiden CpG-Typen noch gut nachweisbar. Autologe Plasma- oder Serumzusätze hemmten die CpG-abhängige IFN- $\alpha$ -Produktion in PBMC.

Durch Hitzeinaktivierung des Serums war IFN- $\alpha$  nach CpG-Stimulation wieder nachweisbar. Folglich sind hitzelabile Blutbestandteile, möglicherweise Nukleasen, die CpG-ODN enzymatisch abbauen, für die Inhibition der CpG-vermittelten Immunstimulation in Vollblut verantwortlich. Da sich IP-10 auch noch in Gegenwart von Blutbestandteilen gut nachweisen lässt, ist dieses CpG-induzierte Chemokin ein wertvoller Messparameter, um die systemische Immunstimulation durch CpG-ODN *in vivo* überprüfen zu können.

Untersuchungen der antiviralen Aktivität von CpG-ODN gegenüber *Simian immunodeficiency virus* zeigten, dass CpG-induzierte lösliche Faktoren (Kulturüberstände von CpG-stimulierten Rhesus-PBMC) eine antivirale Wirkung gegenüber SIV haben. Im Vergleich zur Kontrolle (SIV w/o CpG-ODN) schützten CpG-induzierte lösliche Faktoren SIV-permissive T-Zellen vor einer SIV-Infektion. Außer dem von PDC bei CpG-Stimulation produzierten IFN- $\alpha$  sind offenbar noch andere durch CpG-induzierte lösliche Faktoren an der antiviralen Wirkung beteiligt, da das schwach IFN- $\alpha$  induzierende CpG-B einen stärkeren Schutz vor der Virus-Infektion bewirkte als CpG-A oder rekombinantes IFN- $\alpha$ .

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

### 4.2.1 Aktivierung von NKT-Zellen durch CpG-aktivierte PDC

#### *Kokultur angereicherter NKT-Zellen mit autologen PBMC*

Die Entwicklung einer Methode zur Isolation von NKT-Zellen aus PBMC über magnetisch markierte Antikörper gegen die spezifische  $\alpha$ -Kette des TCR ermöglichte erstmals das Arbeiten mit frischen humanen NKT-Zellen (Abb. 4B). In bisherigen Arbeiten mit humanen NKT-Zellen wurden meist NKT-Zelllinien verwendet, die man z.B. in Gegenwart Antigen-präsentierender Zellen, des spezifischen Antigens  $\alpha$ -GalCer und bestimmter Zytokine (IL-2 (Brossay, 1998) oder IL-7 und IL-15 (van der Vliet, 2001)) generierte. Die *in vitro*-Expansion einer Zelllinie birgt das Risiko, dass die Eigenschaften der neu generierten Zelllinie nicht mehr den ursprünglichen, physiologischen entsprechen. Daher ist zur Untersuchung der physiologischen Funktion von NKT-Zellen das Arbeiten mit frisch isolierten NKT-Zellen besser geeignet.

NKT-Zellen wurden in Kokultur mit autologen PBMC mit CpG-ODN und  $\alpha$ -GalCer stimuliert. Die Gegenwart der PBMC war aus zwei Gründen notwendig: (1) Da NKT-Zellen selbst kein TLR9 exprimieren, mussten die CpG-Targetzellen B-Zellen und PDC, die als einzige im humanen System TLR9 exprimieren und CpG-DNA direkt erkennen (Hornung, 2002), anwesend sein. (2) NKT-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen  $\alpha$ -GalCer, wenn dieses CD1d-gebunden von APC präsentiert wird (Brossay, 1998; Spada, 1998). Folglich müssen CD1d-tragende APC im System präsent sein.

Um die Aktivierung der seltenen NKT-Zellen besser darstellen zu können, wurden diese zunächst aus frisch präparierten PBMC isoliert und dann in einem Verhältnis von ca. 1:10 wieder zu autologen PBMC gegeben, so dass ihre Frequenz in PBMC gegenüber den physiologischen Bedingungen ca. 20- bis 40-fach erhöht war. Es ist zu überlegen, ob dieser Versuchsansatz mit einer unphysiologisch hohen NKT-Zellpopulation innerhalb von PBMC (bis zu 10% NKT-Zellen in PBMC) geeignet ist, die physiologische Funktion der NKT-Zellen zu untersuchen, oder ob in diesem Setting möglicherweise Effekte von NKT-Zellen verfälscht werden. In Vorversuchen mit normalen PBMC (ca. 0,2% NKT-Zellen) war jedoch eine entsprechende NKT-Zellaktivierung durch Stimulation mit CpG-ODN und  $\alpha$ -GalCer beobachtet worden, sowohl auf Einzell-Ebene im Durchflusszytometer (CD69), als auch auf Zytokinebene (IFN- $\gamma$ ; Daten nicht abgebildet). Nach diesen ersten Experimenten in normalen PBMC ging man zu einem Versuchsansatz mit



angereicherten NKT-Zellen in PBMC über, um die Aktivierung der seltenen NKT-Zellen besser darstellen zu können.

Die Messung von Zytokinen, z.B. IFN- $\gamma$ , aus PBMC-Kulturüberständen im ELISA detektiert das gesamte von PBMC während einer Kultur sezernierte IFN- $\gamma$ . Demgegenüber kann man im Durchflusszytometer Zytokine durch intrazelluläre Anfärbung auf Einzelzell-Ebene nachweisen und dadurch den Produzenten genau festlegen. Eine intrazelluläre Zytokinmessung in NKT-Zellen war aufgrund folgender methodischer Schwierigkeiten nicht durchführbar: Erstens unterliegen NKT-Zellen nach Stimulation zu einem großen Prozentsatz dem sogenannten "*Activation-induced cell death*". Daher ist die NKT-Zellpopulation ein bis zwei Tage nach Stimulation oft drastisch reduziert. Zweitens führt die im Rahmen der Intrazellulärfärbung durchgeführte Fixation und Permeabilisation der Zellen zu einer Herunterregulation oder Schädigung des TCR von NKT-Zellen, so dass die detektierten Zytokine nicht mehr NKT-Zellen zugeordnet werden können. Im vorliegenden Modell sprechen jedoch zwei Gründe dafür, dass das in den Kulturüberständen im ELISA detektierte IFN- $\gamma$  von NKT-Zellen stammt: In den Kulturüberständen von angereicherten NKT-Zellen innerhalb von PBMC wurden sehr hohe Mengen an IFN- $\gamma$  nach CpG-Stimulation gemessen, wenn (1) mit dem NKT-Zell-spezifischen Antigen  $\alpha$ -GalCer kostimuliert wurde (Abb. 6C) und (2) wenn die Frequenz der NKT-Zellen innerhalb von PBMC durch MACS-Anreicherung erhöht war (Abb. 6E). Daraus ist ersichtlich, dass das in den Kulturüberständen im ELISA bestimmte IFN- $\gamma$  nicht von anderen IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen innerhalb von PBMC stammt (z.B. NK-Zellen oder konventionellen T-Zellen), sondern von  $\alpha$ -GalCer-spezifischen NKT-Zellen.

#### *TLR-Expression in NKT-Zellen und CpG-Sensitivität*

Die Erkennung Pathogen-assoziiertes molekularer Strukturen - wie CpG-DNA - über die Toll-like Rezeptoren vermittelt dem Vertebraten-Immunsystem ein Gefahrensignal und initiiert als Konsequenz eine Immunantwort (Akira, 2001; Hemmi, 2000). Als Antigen-präsentierende Zellen übernehmen dendritische Zellen eine entscheidende Schlüsselfunktion in der Induktion einer T-Zell-vermittelten Immunität. Daher ist nicht verwunderlich, dass dendritische Zellen eine besonders hohe TLR-Expression aufweisen, während T-Zellen und NK-Zellen kaum TLR exprimieren (Krug, 2001b; Hornung, 2002). Bisher ist nur von B-Zellen und PDC bekannt, dass sie TLR9 exprimieren und dadurch direkt durch CpG-DNA stimuliert werden können.

Die Untersuchung der TLR-Expression in NKT-Zellen zeigte, dass NKT-Zellen kein TLR9 exprimieren, dafür in geringem Ausmaß TLR1 und 5 (Abb. 5). Konventionelle T- und NK-Zellen haben ein ganz ähnliches TLR-Expressionsmuster wie NKT-Zellen. Beide weisen eine niedrige bzw. fehlende TLR-Expression auf und exprimieren nur marginale Mengen an TLR9 (Hornung, 2002). In NK-Zellen wird TLR1 am höchsten exprimiert, daneben in geringem Maß TLR2, 3, 5

und 6. TLR1 wird auch in den meisten anderen Immunzellen exprimiert (neben NK-Zellen, auch in Monozyten, B-Zellen, MDC und PDC) (Krug, 2001b; Hornung, 2002). In T-Zellen ist die TLR-Expression noch schwächer ausgeprägt als in NK-Zellen. Im wesentlichen ist nur TLR5 in T-Zellen nachweisbar, eventuell auf sehr niedrigem Niveau noch TLR1. TLR5, die Erkennungsstruktur für Flagellin (Hayashi, 2001), wird außer in  $\alpha/\beta$  T-Zellen und NK-Zellen auch in Monozyten und MDC exprimiert.

Somit teilen humane NKT-Zellen mit NK-Zellen und  $\alpha/\beta$  T-Zellen die insgesamt sehr niedrige TLR-Expression, das Fehlen von TLR9 und damit verbunden die fehlende CpG-Sensitivität. Darüber hinaus tragen NKT-Zellen die beiden TLR (1 und 5), die auch in NK- (TLR1) bzw.  $\alpha/\beta$  T-Zellen (TLR5) am stärksten exprimiert werden.

Das TLR-Expressionsprofil von NKT-Zellen wurde über deren mRNA erstellt und nicht auf Protein-Ebene überprüft. Grundsätzlich ist zu bedenken, dass sich die Protein-Expression von der mRNA einer Zelle unterscheiden kann. Man könnte sich z.B. vorstellen, dass die mRNA von Proteinen mit einer sehr langen Lebensdauer nicht zu jedem Zeitpunkt exprimiert wird. Die bisher in unserer Arbeitsgruppe erhobenen mRNA-Daten zur TLR-Expression von humanen Immunzellen korrelieren jedoch sehr genau mit den *in vitro* erhobenen funktionellen Daten, d.h. mit der Sensitivität gegenüber TLR-Liganden (Hornung, 2002). Basierend auf diesen Vorarbeiten kann man davon ausgehen, dass die TLR-Expression auf mRNA-Ebene gut mit der auf Protein-Ebene korreliert.

Eine erst kürzlich veröffentlichte Publikation von Caramalho und Mitarbeitern deutet darauf hin, dass die geringe, aber konsistente Expression von TLR in Effektorzellen, wie NK-Zellen und T-Zellen, funktionelle Relevanz haben könnte (Caramalho, 2003). Caramalho et al. wiesen TLR4 in regulatorischen T-Zellen der Maus nach und bestätigten dessen Funktionalität *in vitro* und *in vivo*. Die regulatorische Aktivität der T-Zellen wurde *in vivo* durch den PAMP-Stimulus (LPS) verstärkt. Offensichtlich unterscheiden sich T-Zellen in ihrem TLR-Expressionsprofil in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsstadium, da TLR4 nur auf regulatorischen, nicht auf naiven T-Zellen nachgewiesen wurde. Die Daten von Caramalho et al. lassen vermuten, dass PRR - bisher als primäres *Tool* von APC verstanden - auch die Aktivität von Effektorzellen regulieren können. Möglicherweise kann durch Ligation von PRR auf Effektorzellen in späteren Stadien einer Immunantwort die zelluläre Immunität moduliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden NKT-Zellen vor der mRNA-Extraktion für die TLR-Bestimmung ohne exogenen Stimulus für drei Stunden inkubiert (s. 2.5 nach (Hornung, 2002)). In der Literatur ist beschrieben, dass NKT-Zellen - ähnlich regulatorischen T-Zellen - nach Aktivierung immunmodulierende Eigenschaften übernehmen können (zusammengefasst in (Taniguchi, 2003), s. 1.6.4). Im Hinblick auf die von Caramalho veröffentlichten Daten wäre die

Untersuchung differenzierter NKT-Zellen - z.B. nach Aktivierung durch ihr spezifisches Glykolipid-Ag bzw. nach Isolation aus einem Pathogesehen - von Interesse. Möglicherweise verändert sich die TLR-Expression in NKT-Zellen ebenfalls im Laufe ihrer Differenzierung. Durch die TLR-Expressionsanalyse von NKT-Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien ließen sich möglicherweise Rückschlüsse auf deren Funktion in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen ziehen.

### *CD1d-Expression im Menschen*

CD1-Proteine sind  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2m)-assoziierte Transmembran-Moleküle, die strukturelle Verwandtschaft mit MHC-Molekülen besitzen (Janeway, 2001). CD1-Proteine auf APC binden Lipid- und Glykolipid-Antigene und präsentieren diese T-Zellen. Im Gegensatz zu MHC-Molekülen unterliegen CD1-Moleküle keinem Polymorphismus, sondern sind monomorph. Zwei Gruppen von CD1-Proteinen werden unterschieden: Gruppe 1 (CD1a-c) und Gruppe 2 (CD1d). CD1-Proteine der Gruppe 1 können durch Fremdanigen-Präsentation spezifische T-Zellen aktivieren und eine adaptive zellvermittelte Immunantwort initiieren. Demgegenüber nehmen CD1d-Proteine funktionell wahrscheinlich eher eine Zwischenstellung zwischen angeborener und erworbener Immunität ein: CD1d-restringierte T-Zellen produzieren bei Erkennung ihres Antigens sehr hohe Mengen an Zytokinen und verstärken dadurch indirekt die Ausbildung einer Immunität (Dascher, 2003).

Die Erkennung von  $\alpha$ -GalCer durch NKT-Zellen ist CD1d-restringiert (Kawano, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das CD1d-Expressionsprofil in frisch isolierten humanen PBMC unterschiedlicher gesunder Spender untersucht. Damit sollte die Fragestellung beantwortet werden, welche APC-Populationen im peripheren Blut NKT-Zellen das CD1d-restringierte Glykolipidantigen  $\alpha$ -GalCer präsentieren können. Ausschließlich myeloide DC exprimierten in PBMC CD1d und die Depletion der MDC führte konsequenterweise zu einem Verlust der Antigen-spezifischen Aktivierung von NKT-Zellen (Abb. 7A+B). Beide CpG-Zielzellen, PDC und B-Zellen, können somit aufgrund fehlender CD1d-Expression die Antigen-spezifische Stimulation von NKT-Zellen nicht über eine verstärkte Antigen-Präsentation erhöhen.

Erste Berichte über das CD1d-Expressionsprofil im Menschen deuten darauf hin, dass CD1d-Proteine im Organismus sehr verbreitet in verschiedenen Geweben und auch auf Nicht-Immunzellen exprimiert werden (Exley, 2000). So wurde CD1d unter anderem im Gastrointestinaltrakt, in der Leber, Haut und Niere nachgewiesen, innerhalb der jeweiligen Gewebe meist auf Epithelzellen (Canchis, 1993). Exley berichtete über eine hohe CD1d-Expression auf Thymozyten von Kindern (Exley, 2000). Im Unterschied zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist in anderen Veröffentlichungen eine CD1d-Expression auf humanen B-Zellen und Monozyten aus dem peripheren Blut gesunder Spender beschrieben worden (Exley, 2000; van der

Vliet, 2001). Auch T-Zellen sollen schwach CD1d<sup>+</sup> sein (van der Vliet, 2001). Gerlini und Mitarbeiter wiesen CD1d auf dermalen DC aus gesunder Haut nach (Gerlini, 2001). In derselben Arbeit berichteten die Autoren über Unterschiede in der CD1d-Expression auf monoDC in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen. Während monoDC in Gegenwart von autologem Plasma CD1d exprimierten, induzierte die Gegenwart von FCS eine Herunterregulation von CD1d. Colgan und Mitarbeiter berichteten vor kurzem, dass lösliche Darmbestandteile von gesunden Freiwilligen *in vitro* CD1d auf Epithelzellen induzierten (Colgan, 2003). Die Autoren identifizierten HSP110 als funktionelle Hauptkomponente der CD1d-induzierenden Darmbestandteile und vermuteten, dass über CD1d-Moleküle mukosale Entzündungsprozesse des Darms reguliert werden. Bisher ist nicht bekannt, welche Funktionen CD1d-Moleküle - neben der Bindung von Fremdanigen auf APC - auf epithelialen Zellen oder T-Zellen haben könnten.

Im Gegensatz zu Berichten aus der Literatur wurde in der vorliegenden Arbeit bei keinem der untersuchten Spender ( $n=5$ ) CD1d auf B-Zellen oder Monozyten nachgewiesen. Die Ursache für die Diskrepanz zwischen den Daten könnte sein, dass die CD1d-Expression einem Regulationsmechanismus unterliegt und vom Differenzierungsstadium bzw. Aktivierungsgrad einer Zellpopulation abhängig ist.

Die neusten Ergebnisse von Colgan et al. weisen sehr eindrucksvoll darauf hin, dass die Expression von CD1d einer Regulation unterworfen ist (Colgan, 2003). Neben Stressfaktoren, wie HSP110, könnten auch andere (patho-)physiologische Faktoren die CD1d-Expression regulieren. Auch Kulturbedingungen beeinflussen offenbar die Expression von CD1d (Gerlini, 2001). Darüber hinaus wirkt sich wahrscheinlich der Differenzierungsgrad einer Zelle auf die CD1d-Expression aus. Nach eigenen Versuchen ist die CD1d-Expression auf *in vitro*-generierten monoDC von ihrem Differenzierungsgrad abhängig. Unreife monoDC exprimierten kein CD1d, erst ausgereifte monoDC waren CD1d<sup>+</sup>. Auf B-Zellen und PDC veränderte sich das CD1d-Expressionsmuster durch Stimulation mit CpG-ODN innerhalb von 48 Stunden jedoch nicht. Den Literaturdaten zufolge kann man vermuten, dass exogene Einflüsse für die Unterschiede im CD1d-Expressionsprofil dieser Arbeit im Vergleich zu früheren Publikationen verantwortlich sind. Die starke Regulation von CD1d macht offenbar eine Verallgemeinerung der Ergebnisse problematisch. In der vorliegenden Arbeit bestätigt jedoch die Depletion der MDC und der daraus resultierende Verlust der NKT-Zell-Aktivierung durch das CD1d-restringierte Ag die funktionelle Relevanz des erhobenen CD1d-Expressionsprofils.

#### *Die NKT-Zelle als eine besonders CpG-sensitive Zelle?*

Bisher war bekannt, dass bei mikrobieller Infektion bzw. bei CpG-Stimulation NK-Zellen,  $\gamma/\delta$  T-Zellen und Memory-T-Zellen innerhalb von PBMC für die frühe IFN- $\gamma$ -Produktion in der ersten Phase einer Immunreaktion verantwortlich sind (Rothenfusser, 2001). Diese Arbeit zeigt, dass auch

NKT-Zellen bei CpG-Stimulation sofort IFN- $\gamma$  produzieren können. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass NKT-Zellen unter physiologischen Bedingungen in der ersten Phase einer Immunreaktion aktiviert werden und Effektorfunktionen übernehmen.

NKT-Zellen sind voraktivierte Memory-T-Zellen, die eine Spezifität für das Glykolipid-Antigen  $\alpha$ -GalCer besitzen. Aufgrund der fehlenden TLR9-Expression reagieren NKT-Zellen nicht direkt auf CpG-Stimulation. Innerhalb von PBMC werden NKT-Zellen jedoch durch CpG-Stimulation ohne Anwesenheit ihres spezifischen Antigens aktiviert (s. CD69-Expression, IFN- $\gamma$ -Produktion; Abb. 6B+C). Andere Memory-T-Zellpopulation, wie die  $\gamma/\delta$  T-Zellen, werden ebenfalls ohne zusätzliche Antigen-Stimulation innerhalb von PBMC durch CpG-ODN aktiviert (Rothenfusser, 2001). Naive  $\alpha/\beta$  T-Zellen reagieren dagegen nur in Gegenwart ihres spezifischen Antigens innerhalb von PBMC auf CpG-Stimulation (zusammengefasst in (Krieg, 2002)).

Inzwischen ist bekannt, dass das von PDC bei CpG-Stimulation produzierte Typ-I-IFN selektiv Memory-T-Zellen aktiviert (Tough, 1996; Zhang, 1998; Sprent, 2000; Rothenfusser, 2001). Die Arbeitsgruppe von Männel demonstrierte kürzlich, dass CpG-induziertes Typ-I-IFN die zytotoxische Effektorfunktion von murinen NK-Zellen und NKT-Zellen aktiviert (Hafner, 2001). IFN- $\alpha$  kann entweder direkt Memory-T-Zellen aktivieren oder in APC die Freisetzung von IL-15 induzieren - ein Zytokin, das ebenfalls selektiv Memory-T-Zellen stimuliert (Zhang, 1998; Sprent, 2000). Das starke Ansprechen von NKT-Zellen auf CpG-induzierte Zytokine passt damit gut in das Konzept der - im Vergleich zu naiven T-Zellen - verstärkten Steuerung von Memory-T-Zellen durch Zytokine.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine klare Th1-Differenzierung der NKT-Zellen durch CpG-Stimulation bewirkt (Abb. 6C). Diese Beobachtung stimmt mit den Erkenntnissen aus früheren CpG-Studien überein, dass die CpG-induzierten proinflammatorischen Zytokine - insbesondere IFN- $\alpha/\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-12 - eine Immunantwort in Th1-Richtung lenken (zusammengefasst in (Krieg, 2002)).

#### *Unterschiede zwischen CpG-A und CpG-B in der Aktivierung von NKT-Zellen*

CpG-A und -B induzieren in humanen PBMC ein unterschiedliches Aktivierungsmuster (zusammengefasst in (Rothenfusser, 2003)). CpG-A induziert in PDC sehr hohe Mengen an Typ-I-IFN (Krug, 2001a). Vergleichbar hohe Mengen an IFN- $\alpha/\beta$  werden in PDC bei einer Virusinfektion produziert. Über die Induktion von IFN- $\alpha/\beta$  kommt es zu einer starken Aktivierung von NK-Zellen und Memory-T-Zellen (Rothenfusser, 2001). Monozyten entwickeln unter dem Einfluss von Typ-I-IFN einen DC-artigen Phänotyp (Krug, 2003a). In funktionellen Untersuchungen zeichneten sich die CpG-A-induzierten monoDC dadurch aus, dass sie selektiv die Proliferation von CD8<sup>+</sup> Effektor-Memory-T-Zellen fördern, während das Priming naiver T-Zellen

nicht gesteigert wird. Myeloide DC reifen in Gegenwart von CpG-A-induziertem Typ-I-IFN aus (Abb. 10).

Im Gegensatz zu CpG-A induziert CpG-B nur sehr geringe Mengen bzw. gar kein Typ-I-IFN in PDC (Krug, 2001a). Konsequenterweise kommt es durch CpG-B zu keiner Aktivierung von Effektorlymphozyten (wie NK-Zellen und Memory-T-Zellen) oder myeloiden Zellen (wie Monozyten und MDC). CpG-B führt stattdessen zu einer sehr starken B-Zellaktivierung und zu einer phänotypischen Ausreifung der PDC, gekennzeichnet durch eine verbesserte Überlebensrate sowie durch die Expression von Aktivierungs- und Reifemarkern auf beiden CpG-Zielzellen (zusammengefasst in (Rothenfusser, 2003)).

Ähnlich wie in früheren Studien mit  $\gamma/\delta$  T-Zellen, NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> Memory-T-Zellen (Rothenfusser, 2001; Rothenfusser, 2003) wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl die Expression von CD69 als auch die Produktion von IFN- $\gamma$  in NKT-Zellen durch CpG-A mehr gefördert als durch CpG-B. Auch der synergistische Effekt von CpG-A und  $\alpha$ -GalCer war größer als der von CpG-B/ $\alpha$ -GalCer. Dadurch wurde die Th1-Differenzierung der NKT-Zellen ebenfalls durch CpG-A/ $\alpha$ -GalCer stärker gefördert als durch CpG-B/ $\alpha$ -GalCer (Abb. 6A-C).

Eine definitive Erklärung für die funktionellen Unterschiede der beiden CpG-Klassen A und B gibt es bis dato noch nicht. Obwohl beide CpG-Klassen über TLR9 in B-Zellen und PDC erkannt werden, lösen sie eine qualitativ unterschiedliche Aktivierung beider Zelltypen aus. Besonders markant ist der Unterschied in der PDC-Aktivierung durch CpG-A und CpG-B. Stimulation mit CpG-A löst eine massive IFN- $\alpha$ -Produktion in PDC aus; CpG-B hat fast keine IFN- $\alpha$  induzierende Wirkung, aber fördert stärker als CpG-A Überleben und Ausreifung der PDC. Die kürzlich von Kerkmann et al. veröffentlichten Daten weisen darauf hin, dass CpG-A und CpG-B unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren (Kerkmann, 2003). Denkbar ist, dass Unterschiede in der Erkennung, Aufnahme und/oder Bindung an den Rezeptor für die unterschiedliche biologische Aktivität von CpG-A und CpG-B verantwortlich sind.

Neuste Experimente zur Strukturaufklärung der CpG-ODN mithilfe Rasterkraftmikroskopie und Gelelektrophorese geben Hinweise darauf, dass CpG-A im Gegensatz zu CpG-B höhermolekulare, partikelähnliche Strukturen ausbildet (Kerkmann et al., 2003, unveröffentlichte Daten). Verantwortlich für die Komplexbildung von CpG-A sind wahrscheinlich die beiden Poly-G-Enden und die zentrale Palindromsequenz, die über intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen miteinander assoziieren. Auf diese Weise schließen sich viele CpG-A-Moleküle zu partikulären Komplexen zusammen. Derartige Struktur motive (Poly-G-Enden, Palindrom) fehlen in CpG-B, welches nachweislich in Form von Monomeren vorliegt. Die IFN- $\alpha$ -Induktion in PDC durch CpG-A ist von den höhermolekularen Strukturen abhängig, da bei Verlust der Komplexbildung (Modifikation der Poly-G-Enden bzw. der Palindromsequenz, Zerstörung der

Wasserstoffbrückenbindungen durch Erhitzen) die IFN- $\alpha$ -Produktion abfällt. Partikelstruktur in Kombination mit CpG-Motiven scheinen wichtige Charakteristika von CpG-A zu sein, die dafür verantwortlich sind, dass speziell dieser ODN-Typ hohe Mengen an IFN- $\alpha$  und andere Faktoren in PDC induziert, die zu einer Aktivierung von NKT-Zellen führen.

#### 4.2.2 Mechanismen der CpG-induzierten NKT-Zell-Aktivierung

##### *(1) Lösliche Faktoren*

Die Depletion der PDC in einer Kokultur von NKT-Zellen und PBMC führte zu dem Verschwinden der CpG-vermittelten Wirkung auf NKT-Zellen (Abb. 8A). Somit wird die CpG-induzierte Aktivierung der NKT-Zelle durch PDC vermittelt. Überstände von CpG-A-stimulierten PDC induzierten die Aufregulation von CD69 auf NKT-Zellen sowie die Aktivierung und Ausreifung der MDC (Abb. 8B+10). Mehrere, voneinander unabhängige Ergebnisse deuten darauf hin, dass innerhalb der CpG-induzierten Kulturüberstände Typ-I-IFN ein wesentlicher Mediator der CpG-Wirkung auf NKT-Zellen ist: (i) Rekombinantes IFN- $\alpha$  induzierte eine ähnlich hohe Expression von CD69 auf NKT-Zellen wie CpG-A selbst und CpG-Überstände (Abb. 8B). (ii) Das stark IFN- $\alpha$ -induzierende CpG-A aktivierte NKT-Zellen stärker als CpG-B (Abb. 6A-C). (iii) Eine Kombination Typ-I-IFN blockierender Antikörper hemmte die Aktivierung der NKT-Zellen durch CpG-A (Abb. 9A).

In zahlreichen früheren Arbeiten ist die aktivierende Wirkung von Typ-I-IFN auf Effektorlymphozyten, wie NK-Zellen und Memory-T-Zellen, beschrieben worden (Tough, 1996; Zhang, 1998; Sprent, 2000; Rothenfusser, 2001). Sowohl in murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen steigert IFN- $\alpha$  die Zytotoxizität (Biron, 1998; Biron, 2001). In einer kürzlich von der Arbeitsgruppe um Männel durchgeführten Studie bewirkte die Injektion von CpG-ODN eine Rückbildung von experimentellen Lungen- und Lebermetastasen in Mäusen (Hafner, 2001). Dieser CpG-Effekt war in NK-/NKT-Zell-defizienten Mäusen (NK-/NKT-Zell-depletiert bzw.  $\beta$ 2M-defizient) und in Typ-I-IFN-Rezeptor Knock-out Mäusen aufgehoben. Folglich aktiviert CpG-induziertes Typ-I-IFN die zytotoxische Effektorfunktion von murinen NK-Zellen und NKT-Zellen.

CpG-Überstände bzw. rekombinantes IFN- $\alpha$  verstärken auch Aktivierung und Ausreifung der MDC - der APC für NKT-Zellen im peripheren Blut (Abb. 10). Vermutlich bewirken die aktivierten MDC eine verstärkte  $\alpha$ -GalCer-abhängige Aktivierung der NKT-Zellen. Somit wirkt Typ-I-IFN wahrscheinlich zweifach stimulierend auf die NKT-Zelle (i) direkt und (ii) indirekt über die MDC.

Neben IFN- $\alpha$  könnten andere, durch IFN- $\alpha$  induzierte Faktoren die Aktivierung der NKT-Zellen verstärken, die außer von der PDC selbst auch von sekundär aktivierten anderen Immunzellen gebildet werden könnten. IL-15 wird von APC in Gegenwart von IFN- $\alpha$  produziert und aktiviert selektiv Memory-T-Zellen, nicht naive T-Zellen (Zhang, 1998; Sprent, 2000). In einer kürzlich von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichten Arbeit wurde IL-15 auf mRNA-Ebene in monoDC nach CpG-Stimulation nachgewiesen (Krug, 2003a). In der Literatur ist beschrieben, dass IL-15 *in vitro* die Entwicklung und Proliferation von NKT-Zellen verstärkt (van der Vliet, 2001; Ohteki, 2002). Folglich kann man annehmen, dass im vorliegenden Modell CpG-aktivierte PDC Typ-I-IFN ausschütten und APC daraufhin IL-15 produzieren, das NKT-Zellen mitaktiviert.

Die Blockierung von IL-12 zeigte, dass die CpG-vermittelte Wirkung im vorliegenden Modell nicht über IL-12 vermittelt wird (Abb. 9B). Diese Beobachtung lässt sich damit erklären, dass im humanen System - im Gegensatz zum murinen System - durch CpG-ODN kaum IL-12 induziert wird. Dies beruht im wesentlichen auf der fehlenden CpG-Sensitivität myeloider Zellen im humanen System, den hauptsächlichen IL-12-Produzenten. Lediglich in Gegenwart von CD40L produzieren PDC nach CpG-Stimulation geringe Mengen an IL-12 (Krug, 2001b).

Da Typ-I-IFN eine Schlüsselrolle während viraler Infektionen spielt und auch NKT-Zellen als Effektorlymphozyten durch Typ-I-IFN aktiviert werden, lässt sich spekulieren, dass NKT-Zellen eine physiologische Funktion in der antiviralen Abwehr übernehmen.

## *(2) Zellkontakt-abhängige Faktoren*

Mehrere Beobachtungen in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass nicht allein IFN- $\alpha$  für die CpG-induzierte Ag-unabhängige Aktivierung von NKT-Zellen verantwortlich ist: (i) CpG-B war CpG-A in der Aktivierung von NKT-Zellen zwar unterlegen, bewirkte aber ebenfalls eine signifikante Verstärkung der  $\alpha$ -GalCer-spezifischen Aktivierung von NKT-Zellen. Aufgrund der fehlenden bzw. sehr geringen IFN- $\alpha$ -Induktion in PDC durch CpG-B kann dessen aktivierender Effekt auf NKT-Zellen nicht allein auf Typ-I-IFN zurückgeführt werden. (ii) Lösliche Faktoren alleine - rekombinantes IFN- $\alpha$  oder CpG-Kulturüberstände - konnten die  $\alpha$ -GalCer-abhängige IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen nicht steigern (Abb. 11). (iii) In Transwell-Experimenten verstärkten CpG-ODN die CD69-Expression auf NKT-Zellen, jedoch nicht die Antigen-spezifische IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen (Abb. 12).

Demnach ist die CpG-vermittelte Steigerung der IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen zwar von Typ-I-IFN abhängig, setzt jedoch noch ein weiteres, von der PDC ausgehendes Aktivierungssignal voraus. Weil dieses zweite Signal den NKT-Zellen nicht in Form löslicher CpG-Überstände bzw. durch eine semipermeable Membran in Transwells übermittelt werden kann, wurde angenommen, dass die Effektorfunktionen von NKT-Zellen über direkten Zellkontakt mit PDC gesteigert werden.



Damit würde die Steigerung der IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen durch CpG-ODN über zwei verschiedene Mechanismen vermittelt: (i) PDC-produzierte lösliche Faktoren, insbesondere IFN- $\alpha/\beta$  und (ii) direkten Zellkontakt zwischen NKT-Zelle und CpG-stimulierter PDC. In der Literatur sind einige Oberflächenmoleküle beschrieben, die an einer solchen Zellkontakt-abhängigen Interaktion zwischen DC und NKT-Zellen beteiligt sein könnten. So untersuchten Ikarashi et al. *in vitro* die molekulare Wechselwirkung zwischen murinen DC und NKT-Zellen (Ikarashi, 2001). Ihre Ergebnisse eröffnen neue Einblicke in die Regulation der Effektorfunktionen von NKT-Zellen durch zelluläre Interaktion mit DC. Nach Ikarashi verhindert ein konstitutiver hemmender Einfluss der DC auf NKT-Zellen, wahrscheinlich über H-2D/Ly49-Moleküle vermittelt, die Aktivierung der NKT-Zellen. In Gegenwart von Stress-Signalen (z.B. LPS) werden DC aktiviert und reifen aus. Die phänotypische Ausreifung der DC (MHC-II<sup>bright</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>) initiiert einen aktivierenden Signalweg zwischen DC und NKT-Zelle über B7/CD28-Moleküle, der den hemmenden H-2D-abhängigen Einfluss auf NKT-Zellen übertrifft. Die kontaktabhängige Stimulation der NKT-Zelle über B7/CD28-Interaktion führt zu der Ausschüttung hoher Mengen an IFN- $\gamma$  durch die NKT-Zelle.

Dieser von Ikarashi postulierte Mechanismus bezüglich der Interaktion zwischen murinen DC und NKT-Zellen könnte auch in dem vorliegenden Modell zwischen NKT-Zellen und CpG-aktivierten PDC in Betracht gezogen werden. Durch CpG-Stimulation reift die PDC funktionell und phänotypisch aus und ist somit in der Lage, über kostimulatorische Moleküle mit anderen Immunzellen in Wechselwirkung zu treten. Dadurch könnte ein möglicher inhibitorischer Signalweg in der NKT-Zelle durchbrochen und deren Effektorfunktionen verstärkt werden.

Neben der B7/CD28-Interaktion werden dem Ox40/Ox40L-Signalweg während einer T-Zell/DC-Wechselwirkung wichtige regulatorische Funktionen zugeschrieben (Chen, 1999; Weinberg, 1998; Maxwell, 2000). Die Expression von Ox40 bzw. Ox40L ist auf humanen NKT-Zellen bzw. PDC bisher noch nicht untersucht worden. Möglicherweise spielt dieser Signalweg jedoch auch im vorliegenden Modell eine Rolle bei der PDC-NKT-Zell-Interaktion.

Es ist beschrieben, dass NKT-Zellen - analog konventionellen  $\alpha/\beta$  T-Zellen - nach der Erkennung ihres spezifischen CD1d-gebundenen Antigens das kostimulatorische Molekül CD40-Ligand (CD40L) hochregulieren (Kitamura, 1999; Tomura, 1999). Über CD40/CD40L-Moleküle treten NKT-Zellen und Ag-präsentierende DC anschließend in direkte zelluläre Wechselwirkung miteinander. CD40/CD40L-Interaktion zwischen aktivierten T-Zellen und DC induziert Aktivierung und Reifung der DC, regt diese zur IL-12-Sekretion an und vermittelt das für DC notwendige zweite kostimulatorische Signal zum T-Zell-Priming. Offenbar leisten NKT-Zellen nach  $\alpha$ -GalCer-Erkennung somit eine Art "T-Zell-Hilfe" für MDC, indem sie deren Ausreifung und Fähigkeit zum Priming verstärken. Auf diesem Mechanismus könnten die in der Literatur

beschriebenen guten Adjuvanseigenschaften von  $\alpha$ -GalCer beruhen (Gonzalez-Aseguinolaza, 2000; Gonzalez-Aseguinolaza, 2002).

Eine Interaktion über CD40/CD40L-Moleküle könnte im vorliegenden Modell nicht nur zwischen NKT-Zelle und Ag-präsentierender DC (MDC) stattfinden, sondern auch zwischen NKT-Zelle und PDC, die nach selektiver Aktivierung durch CpG-ODN eine hohe CD40-Expression aufweist. Fraglich ist jedoch, ob eine solche Interaktion die Effektorfunktionen von NKT-Zellen verstärken kann. Nach den bisherigen Erkenntnissen löst der CD40/CD40L-Signalweg vor allem eine Aktivierung in Richtung der DC aus. Nach Ikarashi trägt der CD40/CD40L-Signalweg - im Vergleich zum B7/CD28-Pfad - nur marginal zur Überwindung des inhibitorischen H-2D-Einflusses und zur Aktivierung von NKT-Zellen bei (Ikarashi, 2001).

Ähnlich wie NK-Zellen exprimieren auch NKT-Zellen eine Reihe von NK-Rezeptoren, wie NKR1A (=CD161, (Loza, 2002)) und besonders NKG2D (Vivier, 2002). NKG2D ist der aktivierende Rezeptor für das *MHC class I like molecule* MICA (*MHC class I-related chain A*), das bei verschiedenen Formen von zellulärem Stress (z.B. Hitze, oxidativer Stress) an der Oberfläche von Zellen erscheint. Neben MICA wurden MICB und ULBP1-3 als Liganden für NKG2D identifiziert (Vivier, 2002). Interessanterweise induziert IFN- $\alpha$  die Expression der Liganden MICA/B auf DC (Jinushi, 2003). MICA und B sind für die Aktivierung von NK-Zellen verantwortlich, da durch Maskierung von MICA/B mithilfe von Antikörpern die DC-abhängige NK-Zell-Aktivierung verschwindet. Die Ligation von NKG2D auf NK-Zellen triggert dabei vor allem deren zytotoxische Aktivität, aber auch die Zytokinproduktion (Wu, 2000; Pende, 2001; Ho, 2002). In  $\gamma\delta$  T-Zellen verstärkt die Erkennung von MICA durch NKG2D deren Antigen-spezifische Effektorfunktion (Das, 2001). Dieses Prinzip ist auch für CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die NK-Rezeptoren (wie NKG2D) nach Aktivierung aufregulieren, beschrieben (Bauer, 1999; Speiser, 1999; Groh, 2001; Kambayashi, 2000).

Im Gegensatz zu NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist für NKT-Zellen die Funktion der unterschiedlichen NK-Rezeptoren bei der Steuerung ihrer Effektorfunktionen bisher wenig untersucht worden. Im vorliegenden Modell könnte jedoch die Ausschüttung von Typ-I-IFN durch CpG-aktivierte PDC eine verstärkte Expression von MICA/B auf der PDC bewirken. Dies könnte über anschließende kontaktabhängige Interaktion zwischen NKG2D auf der NKT-Zelle und MICA/B auf der PDC zur beobachteten Verstärkung der Effektorfunktion von NKT-Zellen führen.

Grundsätzlich sollte bei der Untersuchung kontaktabhängiger Einflüsse berücksichtigt werden, dass Transwellexperimente eine *in vivo*-Situation nur begrenzt nachstellen können. Wird durch Trennung von Zellen mithilfe einer semipermeablen Membran nicht derselbe Effekt beobachtet wie in den Kontroll-Wells, so könnten theoretisch zwei unterschiedliche Schlüsse daraus gezogen werden: (i) Eine gegenseitige Aktivierung zwischen den Zellpopulationen erfordert direkten

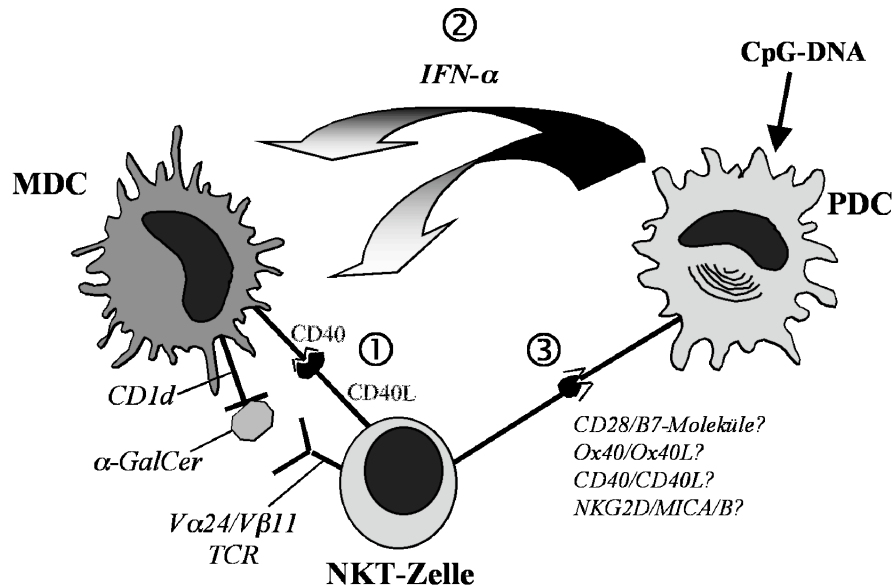
Zellkontakt über Oberflächenmoleküle. (ii) Für die Aktivierung der Zellen werden besonders hohe Konzentrationen löslicher Mediatoren, z.B. IFN, benötigt, welche sich nur bei enger räumlicher Nähe beider Zellpopulationen ergeben. Die Notwendigkeit einer räumlichen Nähe ist somit nicht unbedingt gleichbedeutend mit einem direkten Zellkontakt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine kontaktabhängige Interaktion zwischen PDC und NKT-Zelle nicht funktionell nachgewiesen werden. Erst eine Maskierung von Oberflächenmolekülen mithilfe von spezifischen Antikörpern könnte einen eindeutigen Beweis für eine zellkontakt-abhängige Interaktion zwischen beiden Zellpopulationen liefern. Die aktuelle Literatur liefert jedoch gute Hinweise dafür, dass aktivierte DC Effektorlymphozyten, wie NKT-Zellen, über Chemokine anlocken (Krieg, 2002; Loetscher, 1998; Kim, 2002) und über kontaktabhängige Interaktion regulieren (Ikarashi, 2001; Loza, 2002; Vivier, 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen somit die Existenz eines solchen Mechanismus.

#### *Antigen-unabhängiger Boost durch die PDC*

Fasst man die Ergebnisse von *Teil I* dieser Arbeit zu einem Modell zusammen, könnte folgendes Zusammenspiel zwischen NKT-Zellen, MDC und PDC stattfinden (Abb. 18): NKT-Zellen erkennen über ihren TCR CD1d-gebundenes  $\alpha$ -GalCer, das ihnen von MDC präsentiert wird. NKT-Zellen treten daraufhin über CD40/CD40L-Interaktion in direkten Zellkontakt mit MDC, worauf Aktivierung und Reifung der MDC gefördert werden (Abb. 18, ①). PDC können das Glykolipid-Antigen  $\alpha$ -GalCer aufgrund fehlender CD1d-Expression nicht präsentieren. Durch Stimulation mit CpG-ODN werden PDC zur Ausreifung und zur Produktion von IFN- $\alpha$  und anderer inflammatorischer Zytokine und Chemokine angeregt. Das von PDC produzierte Typ-I-IFN verstärkt die Aktivierung von NKT-Zellen und MDC (Abb. 18, ②). CpG-aktivierte PDC nehmen über Oberflächenmoleküle direkten Zell-zu-Zell-Kontakt mit NKT-Zellen auf, wodurch deren Effektorfunktionen und Th1-Differenzierung verstärkt werden (Abb. 18, ③).

Verallgemeinert man die Ergebnisse dieser Arbeit zur Interaktion von PDC und NKT-Zellen, so lässt sich die Hypothese aufstellen, dass CpG-aktivierte PDC voraktivierte T-Zellen über Zytokine und über Antigen-unabhängigen direkten Zell-zu-Zell-Kontakt stimulieren und dadurch die Antigen-spezifische Aktivierung und Th1-Differenzierung der T-Zellen verstärken können. Neuere Daten unserer Arbeitsgruppe weisen in diese Richtung: In Gegenwart von CpG-aktivierten PDC produzierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei simultaner TCR-Ligation und Kostimulation über anti-CD3/CD28-Beads hohe Mengen an IFN- $\gamma$ . Separierte man die CpG-aktivierten PDC von den CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einem Transwell, verschwand die CpG-induzierte Steigerung der IFN- $\gamma$ -Produktion in den T-Zellen (Prell, D. und Hornung, V., 2003, unveröffentlichte Daten). Offenbar vermitteln PDC auch voraktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen Antigen-unabhängigen, Zellkontakt-abhängigen Boost. Diese

Daten weisen darauf hin, dass NKT-Zellen kein funktionell separater Zelltyp sind, sondern modellhaft einen Subtyp voraktivierter T-Zellen darstellen.



**Abb. 18: Interaktion zwischen NKT-Zelle und den beiden distinkten DC-Typen MDC und PDC.** MDC exprimieren das MHC-I-ähnliche Molekül CD1d und präsentieren NKT-Zellen das Glykolipid-Antigen  $\alpha$ -GalCer. Nach Erkennung ihres spezifischen Antigens regulieren NKT-Zellen CD40-Ligand hoch. MDC und  $\alpha$ -GalCer-aktivierte NKT-Zelle treten über CD40/CD40L-Moleküle in direkte Wechselwirkung miteinander (1), wodurch die MDC ein kostimulatorisches Signal zum Priming von T-Zellen empfängt. CpG-Stimulation führt zur Aktivierung und Ausreifung der PDC sowie zur Ausschüttung hoher Mengen an Typ-I-IFN durch die PDC (2).  $IFN-\alpha/\beta$  verstärkt die Aktivierung von NKT-Zellen und MDC. Über direkten Zell-zu-Zellkontakt zwischen NKT-Zelle und PDC werden die Effektoreigenschaften der NKT-Zelle verstärkt und ihre Differenzierung in Richtung Th1 festgelegt (3).

### *Neubewertung der DC-Funktion von plasmazytoiden DC: Das Prime-Boost-Modell*

Erst vor vier Jahren wurde die plasmazytoide DC als identisch mit der Typ-I-Interferon produzierenden Zelle (IPC) charakterisiert, die bei viraler Infektion hauptsächlich für die hohe Produktion von  $IFN-\alpha/\beta$  verantwortlich ist (Cella, 1999; Siegal, 1999). Aufgrund des Fehlens von Lineage-Oberflächenmarkern (CD3, CD14, CD56, CD19), der Expression von MHC-II-Molekülen, ihrer Eigenschaft, auf mikrobielle Stimulation einen DC-ähnlichen Phänotyp anzunehmen und ihrer Fähigkeit, naive allogene  $CD4^+$  T-Zellen zur Proliferation zu bringen, wurden PDC als ein dendritischer Zelltyp klassifiziert (Colonna, 2002).

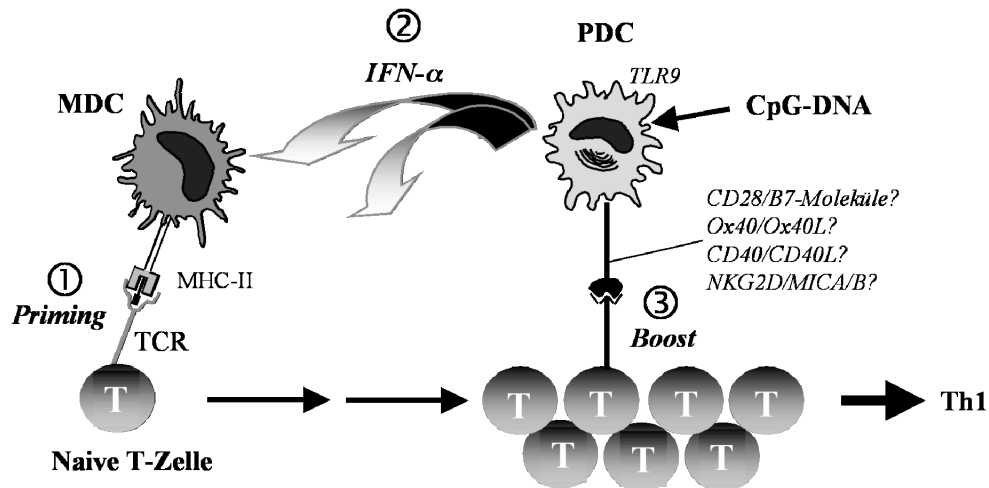
PDC unterscheiden sich morphologisch, phänotypisch und funktionell grundsätzlich von klassischen DC, den myeloiden dendritischen Zellen. Während MDC eine Vielzahl mikrobieller

Stimuli, wie z.B. Endotoxin erkennen können (breites TLR-Muster), exprimieren PDC nur TLR7 und 9. Bisher ist mikrobielle DNA (DNA mit CpG-Motiven, viral oder bakteriell) der einzige molekular definierte Stimulus, der durch die PDC erkannt wird und zur Produktion von IFN- $\alpha$  sowie zur Ausreifung der PDC führt. Im Gegensatz zu MDC besitzen PDC nicht die Fähigkeit zur Phagozytose (unpublizierte Daten, Hartmann et al.). Dieser Befund hat die Klassifizierung der PDC als eine dendritische Zelle im Sinne einer Antigen-präsentierenden Zelle in Frage gestellt. Die einzige Situation, in der die Präsentation eines exogenen Antigens durch die PDC bislang nachgewiesen werden konnte, war bei Infektion der PDC mit einem Virus (Fonteneau, 2003): Influenza Virus-infizierte PDC waren in der Lage, virale Antigene zu präsentieren und CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Influenza-spezifische T-Zellen zu aktivieren. Darüber hinaus waren PDC nur dann in der Lage, naive T-Zellen *in vitro* zu primen, wenn sie mit kurzen Peptidfragmenten gepulst wurden, die direkt auf MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche geladen werden können (Salio, 2003). Daher bleibt fraglich, ob PDC die Fähigkeit zur Antigen-Aufnahme und Prozessierung besitzen. In einer kürzlich von Krug et al. veröffentlichten Arbeit wurde gezeigt, dass PDC - im Gegensatz zu MDC - naive T-Zellen *nicht* primen können (Krug, 2003b). PDC induzierten jedoch die Expansion und Differenzierung von Antigen-erfahrenen T-Zellen in Richtung Th1-Effektorzellen.

In dem vorliegenden Modell können PDC aufgrund der fehlenden Expression von CD1d das spezifische Antigen für NKT-Zellen nicht präsentieren. Dennoch führte ein direkter Zellkontakt mit der natürlichen Memory-T-Zelle im Zusammenspiel mit Typ-I-IFN zu einer Amplifikation deren Effektorfunktion und Th1-Differenzierung. Setzt man diese Ergebnisse in den weiteren Kontext der Frage, welche Funktion PDC im Vergleich zu MDC in der Aktivierung von T-Zellen haben, könnte man folgendes DC-Modell ableiten, das MDC und PDC distinkte Funktionen zuweist und das man als *Prime-Boost-Modell* bezeichnen könnte (Abb. 19): MDC, die im unreifen Zustand starke Phagozytose-Aktivität besitzen, nehmen exogenes Antigen auf, prozessieren dieses und präsentieren Antigen-Fragmente für T-Zellen. Naive T-Zellen erkennen ihr spezifisches, von MDC präsentiertes Antigen und expandieren selektiv (*Priming*, Abb. 19, ①). Die Stimulation z.B. mit CpG-ODN oder die Erkennung von Viren aktiviert PDC zur Ausreifung (Aufregulation kostimulatorischer Moleküle) und zur Produktion hoher Mengen an Typ-I-IFN sowie anderer Zytokine und Chemokine. IFN- $\alpha/\beta$  verstärkt Antigen-unabhängig die Proliferation und Differenzierung der bereits Antigen-aktivierten T-Zellen und führt zu einer erhöhten Aktivierung und Ausreifung von MDC (Abb. 19, ②). Darüber hinaus treten aktivierte PDC über Oberflächenmoleküle in direkten Zellkontakt mit den durch die MDC voraktivierten T-Zellen und verstärken dadurch die Aktivierung und Th1-Differenzierung der T-Zellen (*Boost*, Abb. 19, ③).

Nach diesem Modell ist es eine besondere Funktion von PDC, die Antigen-spezifische Aktivierung von Memory-T-Zellen oder von gerade geprimten T-Zellen zu verstärken und ihre Differenzierung in Richtung Th1-Effektorzellen festzulegen. Damit wird postuliert, dass das Immunsystem durch

funktionell unterschiedliche DC reguliert wird, die jeweils unterschiedliche Aufgaben bezüglich des Primings und der Differenzierung naiver bzw. Memory-T-Zellen übernehmen können.

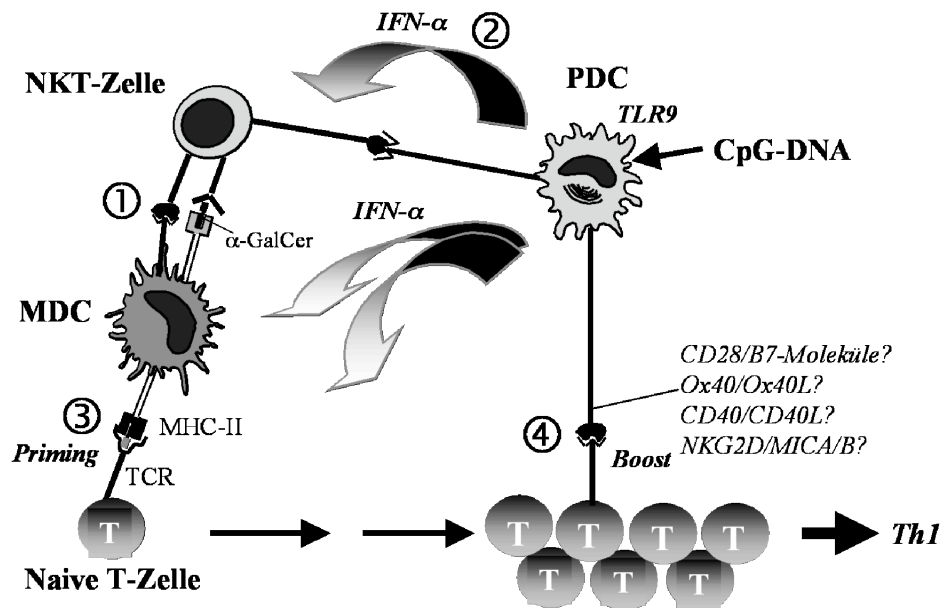


**Abb. 19: Neues DC-Modell: MDC und PDC üben distinkte DC-Funktionen gegenüber T-Zellen aus ("Prime-Boost-Modell").** MDC phagozytieren, prozessieren und präsentieren exogenes Antigen. Naive spezifische T-Zellen erkennen ihr Antigen und expandieren klonal (=Antigen-spezifisches *Priming* durch die MDC (1)). CpG-aktivierte PDC verstärken Aktivierung der MDC und der voraktivierten T-Zellen durch die Ausschüttung von Typ-I-IFN (2). Darüberhinaus tritt die CpG-aktivierte PDC mit den geprimten T-Zellen über kostimulatorische Oberflächenmoleküle in direkten, Antigen-unabhängigen Zellkontakt. Dadurch wird die Antigen-spezifische Aktivierung der T-Zellen verstärkt (=Antigen-unabhängiger *Boost* durch die PDC) und ihre Differenzierung in Richtung Th1 festgelegt (3).

#### *Verstärkter Adjuvans-Effekt auf Effektor-T-Zellen durch Kombination von CpG-ODN und $\alpha$ -GalCer*

Durch die Adjuvans-Kombination CpG-ODN/ $\alpha$ -GalCer könnte die Bildung spezifischer Effektor-T-Zellen im Rahmen einer Immunisierung gegen ein beliebiges Fremdprotein verstärkt werden. Aus den ersten beiden Modellen ergibt sich folgendes Konzept für die Adjuvanskombination CpG-ODN/ $\alpha$ -GalCer (Abb. 20): Nach Erkennung von  $\alpha$ -GalCer auf MDC aktivieren NKT-Zellen MDC über CD40/CD40L-Wechselwirkung (s. Abb. 20, ①). Durch diese "T-Zell-Hilfe" gegenüber der MDC liefern NKT-Zellen das kostimulatorische Signal, das MDC zum Priming naiver T-Zellen befähigt. CpG-aktivierte PDC unterstützen Aktivierung und Ausreifung der MDC durch Ausschüttung inflammatorischer Zykine, z.B. IFN- $\alpha/\beta$  (Abb. 20, ②). Die aktivierten, reifen MDC können dadurch naive T-Zellen gegen ein parallel aufgenommenes Fremdantigen verstärkt primen (Abb. 20, ③). CpG-aktivierte PDC treten mit den durch MDC voraktivierten T-Zellen über

Oberflächenmoleküle in direkten Zellkontakt, wodurch die Funktion und Th1-Differenzierung der T-Zellen verstärkt werden (Abb. 20, ④).



**Abb. 20: Adjuvanskombination CpG-ODN/α-GalCer verstärkt die spezifische zelluläre Immunität.** NKT-Zellen erkennen α-GalCer, das CD1d-gebunden von MDC präsentiert wird. Aktivierte NKT-Zellen interagieren über CD40/CD40L mit MDC und verstärken deren Priming-Fähigkeit (1). CpG-aktivierte PDC schütten hohe Mengen an Typ-I-IFN aus, das NKT-Zellen und MDC aktiviert und deren Ausreifung fördert (2). Die auf diese Weise voraktivierten MDC haben verstärkte Primingfähigkeiten gegenüber naiven T-Zellen. Treffen MDC auf ein neues Immunogen, aktivieren sie verstärkt Ag-spezifische naive T-Zellen (3). Anschließend können CpG-aktivierte PDC mit den voraktivierten T-Zellen in direkten Zellkontakt treten und deren Aktivierung und Th1-Differenzierung verstärken (4).

#### 4.2.3 Anwendung humaner CpG-ODN in einem nicht-humanen Primatenmodell

##### *Etablierung eines Primatenmodells im Rhesusaffen für präklinische Studien mit CpG-ODN*

CpG-ODN mit optimal immunstimulatorischen Eigenschaften im murinen System (sogenannte *murine* CpG-ODN) wirken nur schwach immunstimulatorisch im Menschen (Hartmann, 2000). Daher wurden für die Anwendung im Menschen spezielle CpG-ODN entwickelt, die im humanen System eine starke Immunstimulation bewirken (sogenannte *humane* CpG-ODN). Die Übertragung von Daten aus murinen CpG-Studien auf den Menschen wird auch dadurch erschwert, dass die Verteilung von TLR9 (und damit die CpG-Sensitivität) in murinen und humanen Immunzellen unterschiedlich ist (s. 1.7.5). Aufgrund dieser speziesspezifischen Unterschiede eignen sich außer

der Maus auch andere verbreitete Tiermodelle (z.B. Ratte) nicht für die Austestung humaner CpG-ODN. Präklinische Untersuchungen der Wirksamkeit und Toxizität humaner CpG-ODN müssen daher in einem nicht-humanen Primatenmodell, wie z.B. dem Rhesusaffen, erfolgen.

Die *in vitro*-Untersuchung der Wirkung humaner CpG-ODN in PBMC von Rhesusaffen zeigte, dass sowohl CpG-A als auch CpG-B in Rhesus-PBMC jeweils potente immunstimulatorische Aktivität besitzen. Dabei induzierten die beiden distinkten CpG-Typen unterschiedliche Immunantworten. CpG-A induzierte hohe Mengen an IFN- $\alpha$ , wodurch indirekt Monozyten und andere Immunzellen (T-Zellen, NK-Zellen) aktiviert wurden (Abb. 14A+B). CpG-B aktivierte präferentiell B-Zellen (Proliferation, Aufregulation von Aktivierungsmarkern, IL-6-Ausschüttung; Abb. 14C+D) und induzierte die Ausreifung der plasmazytoiden DC. Entsprechende Versuche mit CpG-ODN in humanen PBMC liefern identische Ergebnisse: CpG-A aktiviert PDC zur massiven IFN- $\alpha$ -Produktion, wodurch myeloide Zellen und Effektorzellen sekundär aktiviert werden (Krug, 2001a). Aufgrund der schwachen IFN- $\alpha$ -Induktion in PDC durch CpG-B werden andere Immunzellen durch CpG-B deutlich schwächer aktiviert als durch CpG-A. CpG-B bewirkt in erster Linie eine sehr starke Aktivierung der B-Zelle (Krieg, 1995); daneben fördert CpG-B Überleben und Ausreifung der PDC (Krug, 2001b).

Bisher hatte niemand Existenz und Funktion der plasmazytoiden DC im Rhesusaffen untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals PDC im peripheren Blut von Rhesusaffen nachgewiesen werden (Abb. 13). Rhesus-PDC exprimieren dieselben Oberflächenantigene wie humane PDC (lin<sup>-</sup>/HLADR<sup>+</sup>/CD123<sup>+</sup>). In Rhesusaffen wurde eine ähnliche PDC-Frequenz wie im Menschen (0,2-0,4% im humanen peripheren Blut (Rothenfusser, 2002)) nachgewiesen.

Das Aktivierungsmuster in Rhesus-PBMC nach CpG-Stimulation weist darauf hin, dass der Rhesusaffe dieselben CpG-Zielzellen wie der Mensch besitzt: Die hohe IFN- $\alpha$ -Induktion in Rhesus-PBMC durch CpG-A deutet auf eine selektive Aktivierung der PDC durch diesen CpG-Typ hin; die starke Aktivierung von Rhesus-B-Zellen durch CpG-B weist darauf hin, dass Rhesus-B-Zellen CpG-ODN direkt erkennen. Im Gegensatz zum murinen System induziert CpG-Stimulation in Rhesus-PBMC keine Ausschüttung von IL-12 (eigene Beobachtungen und Kommunikation mit Arthur Krieg). Daraus kann man schließen, dass myeloide Zellen, die hauptsächlich IL-12-Produzenten, im Rhesusaffen nicht direkt durch CpG-ODN stimuliert werden. Das entspricht der Situation im humanen System, da humane myeloide Zellen ebenfalls kein TLR9 exprimieren und konsequenterweise nicht direkt durch CpG-ODN aktiviert werden (Krug, 2001b).

Schließlich ist die Aktivität von CpG-ODN in humanen PBMC und in Rhesus-PBMC nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ zu beurteilen: Werden die CpG-Zielzellen in Rhesusaffen durch CpG-ODN genauso stark aktiviert wie humane Zellen? Auf den ersten Blick ist die IFN- $\alpha$ - und IL-6-Ausschüttung in Rhesus-PBMC nach CpG-Stimulation jeweils niedriger als in humanen PBMC.



In Rhesus-PBMC induzierte ODN 2216 durchschnittlich 320pg/ml IFN- $\alpha$  (s.Abb 14A). In humanen PBMC liegen die IFN- $\alpha$ -Messwerte nach Stimulation mit ODN 2216 mindestens 10-fach höher (ca. 5000pg/ml (Hartmann, 2003)). Die Kreuzreaktivität des humanen IFN- $\alpha$ -ELISA mit Rhesus-IFN- $\alpha$  soll laut Hersteller 20% betragen (PBL, New Brunswick, USA). Die Messwerte von Rhesus-IFN- $\alpha$  nach Stimulation mit CpG-A liegen jedoch noch deutlich unter 20% der entsprechenden humanen Messwerte. Nach Stimulation mit ODN 2006 wurden in Rhesus-PBMC durchschnittlich 340pg/ml IL-6 gemessen (s.Abb. 14C). In humanen PBMC induziert ODN 2006 etwa 1000pg/ml IL-6 (Hartmann, 2003). Die Kreuzreaktivität des IL-6-ELISA mit Rhesus-IL-6 ist bisher nicht bestimmt worden. Nach den durchgeführten Messungen kann man nicht beurteilen, ob Rhesus-PBMC auf Stimulation mit humanen CpG-ODN weniger Zytokine produzieren als humane PBMC oder ob die Messwerte der Rhesus-Zytokine aufgrund einer geringen Kreuzreaktivität der humanen ELISA-Antikörper niedriger sind als in humanen PBMC. Diese Frage kann erst dann geklärt werden, wenn speziespezifische Mess-Systeme zur Verfügung stehen, mit denen Rhesus-Zytokine exakt quantifiziert werden können.

Zusammenfassend ist der Rhesusaffe aus folgenden Gründen ein sehr gutes Modell zur Untersuchung der Aktivität humaner CpG-ODN: (1) Optimal immunstimulatorische humane CpG-ODN zeigen auch eine sehr starke Aktivität im Rhesusaffen. (2) Beide CpG-Typen, CpG-A und -B, induzieren in Rhesus-PBMC jeweils ein identisches Aktivierungsmuster wie in humanen PBMC. (3) Anders als in der Maus sind die CpG-Zielzellen im Rhesusaffen dieselben wie im humanen System.

#### *Adjuvans-Wirkung von CpG-A und CpG-B im Rhesusaffen*

Die *in vivo*-Untersuchung der Adjuvans-Wirkung von CpG-ODN im Rhesusaffen zeigte, dass sowohl CpG-A als auch CpG-B die Antigen-spezifische humorale Immunantwort auf eine Hepatitis B-Vakzine verstärken (s. Abb. 15A).

In früheren Studien ist CpG-B bereits als Adjuvans in Mäusen (Chu, 1997; Weiner, 1997; Davis, 1998; Moldoveanu, 1998) und nicht-humanen Primaten (Jones, 1999; Davis, 2000; Hartmann, 2000) eingesetzt worden. In Mäusen induzierte die Kombination von CpG-B mit Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) eine verstärkte humorale und zellvermittelte Immunität, die nach einer geringeren Anzahl von Dosen als in der Kontroll-Gruppe erreicht wurde (Davis, 1998). In Orangutans, die ohne CpG-Zusatz nicht auf eine HBs-Vakzine ansprachen (sog. Non-Responder), wurde durch Kombination von HBs-Ag mit CpG-B die Hyporesponsivität überwunden und ein spezifischer Impfschutz gegen Hepatitis B induziert (Davis, 2000).

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Adjuvanseigenschaften der beiden distinkten CpG-Typen A und B weder in der Maus noch im Primaten miteinander verglichen worden. Der in dieser Studie

verwendete Impfstoff Engerix-B induziert die Bildung spezifischer Antikörper gegen HBsAg (Anti-HBs-Antikörper). Ein Anti-HBs-Antikörpertiter von mindestens 10mIU/ml korreliert mit einem Schutz vor einer HBV-Erkrankung (Hadler, 1986; Davis, 2000). Zur Induktion eines ausreichenden Impfschutzes werden für die meisten Individuen drei hintereinander folgende Dosen von Engerix B innerhalb von sechs Monaten benötigt. Diese Arbeit zeigt, dass beide CpG-Typen in Kombination mit Engerix B verabreicht bereits nach einer einmaligen Impfung Serum-Antikörper im protektiven Titerbereich induzieren. In der Kontrollgruppe (Engerix B w/o CpG ODN) reichte eine einmalige Impfung nicht aus, um Anti-HBs-Antikörpertiter über 10mIU/ml zu induzieren. In beiden CpG-Gruppen waren die AK-Titer im Vergleich zur Kontroll-Gruppe etwa 10- bis 15-fach erhöht. Im Gegensatz dazu wurde die Bildung spezifischer T-Zellen durch CpG-ODN in der vorliegenden Studie nicht gefördert: In einem Proliferationsassay, in dem Rhesus-PBMC der geimpften Affen mit Hepatitis B-Ag *in vitro* restimuliert wurden, kam es weder in PBMC der beiden CpG-Gruppen noch in PBMC der Kontrollgruppe zu einer verstärkten Proliferation Hepatitis B-spezifischer T-Zellen (Daten nicht gezeigt; Proliferationsassay durchgeführt von R. Ignatius/P. Renner Viveros, Institut f. Med. Mikrobiologie und Infektionsimmunologie, Charité, Berlin). Daraus wird ersichtlich, dass das Priming Hepatitis-B-spezifischer T-Zellen durch CpG-ODN nicht gefördert wurde. Nach dem oben diskutierten Prime-Boost-Modell könnte die fehlende direkte Aktivierung der MDC durch CpG-ODN ein Grund dafür sein, warum in der vorliegenden Studie nach CpG-Gabe die T-Zellimmunität nicht verstärkt wurde. In zukünftigen Studien könnte getestet werden, ob die Adjuvans-Kombination CpG-ODN/ $\alpha$ -GalCer die Primingfähigkeit der MDC und die spezifische T-Zell-Antwort synergistisch verstärkt.

In einer kürzlich von der Arbeitsgruppe um Klinman veröffentlichten Studie verstärkten beide CpG-Typen A und B (in seiner Studie mit  $D=A$  und  $K=B$  benannt) jeweils die spezifische humorale Immunantwort auf eine Alum-haltige Ovalbumin (OVA)-Vakzine im Rhesusaffen (Verthelyi, 2002). Darüber hinaus erhöhten beide CpG-Typen in Kombination mit einer Alum-haltigen, hitzeinaktivierten Leishmania-Vakzine (CpG-A bzw. -B + Alum + HKLV) im Vergleich zur Kontrolle (Alum + HKLV) die Zahl Leishmania-spezifischer, IFN- $\gamma$ -produzierender T-Zellen. Bei *in vivo*-Provokation der geimpften Tiere mit Leishmania-Erregern beobachtete man jedoch nur bei den Tieren aus der CpG-A-Gruppe (CpG-A + Alum + HKLV) eine starke Reduktion der charakteristischen Hautläsionen einer Leishmaniose. Im Gegensatz dazu waren die Hautläsionen in den Tieren der CpG-B-Gruppe (CpG-B + Alum + HKLV) und Kontrollgruppe (Alum + HKLV w/o CpG ODN) in gleichem Maß vergrößert (Verthelyi, 2002). Die Arbeitsgruppe von Klinman schloss daraus, dass CpG-A im Primaten aufgrund der hohen IFN- $\alpha$ -Induktion in PDC besser geeignet ist als CpG-B, um eine Th1-gerichtete Immunantwort zu verstärken. - Das Ergebnis des Proliferationsassays in der Verthelyi-Studie ist deutlich besser als das in der vorliegenden Hepatitis B-Studie, in der keiner der beiden CpG-Typen die spezifische zelluläre Immunität verstärkte.

Offensichtlich sind Leishmania-Antigene bessere T-Zell-Antigene als Hepatitis B-Ag, d.h. besser geeignet, um in Kombination mit CpG-ODN eine spezifische T-Zellantwort zu induzieren.

In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie und in der Verthelyi-Studie verstärkte CpG-A in Rhesusaffen mindestens genauso effektiv die humorale Immunantwort auf eine Vakzine wie CpG-B. Diese Ergebnisse erscheinen zunächst erstaunlich, da CpG-B *in vitro* sehr viel stärker B-Zellen aktiviert als CpG-A, welches präferentiell PDC zur IFN- $\alpha$ -Produktion aktiviert. Aktuelle Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch, dass CpG-aktivierte PDC die B-Zellaktivierung über zwei Mechanismen steigern können, über (i) IFN- $\alpha$ -Ausschüttung und (ii) direkten Zellkontakt mit der B-Zelle (Poeck, 2003 *in press*). Daraus folgt, dass PDC nach Erkennung von CpG-A die B-Zellaktivierung und konsequenterweise die humorale Immunantwort sehr effektiv über direkte und indirekte Mechanismen verstärken können.

Der Adjuvanseffekt von CpG-ODN hängt ganz wesentlich von dem Applikationsweg ab, über den CpG-ODN verabreicht werden. Wie die vorliegende Arbeit und die Verthelyi-Studie zeigen, verstärken CpG-ODN bei intramuskulärer (i.m.; vorliegende Hepatitis B-Studie) bzw. subkutaner (s.c.; (Verthelyi, 2002)) Applikation im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe die Immunisierung gegenüber einem spezifischen Antigen. Demgegenüber wurde nach mukosal-tonsillärer oder nach intravenöser (i.v.) Gabe einer CpG-basierten Vakzine in Rhesusaffen keine systemische Immunreaktion erreicht (eigene Daten und Kommunikation mit A. Krieg). Nach Inhalation einer CpG-basierten Vakzine war nach einer Lavage der Lunge lediglich eine lokale Aktivierung der Immunzellen durch CpG-ODN nachweisbar, nicht jedoch eine systemische Immunreaktion (Kommunikation mit A. Krieg). Die Gründe für die fehlende CpG-Wirkung bei i.v.- und mukosaler CpG-Applikation sind bisher nicht genau geklärt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Vollblut und Serum bzw. Plasma geben Hinweise darauf, dass Blutbestandteile die CpG-Wirkung inhibieren können (s. Abb. 16A-D). Möglicherweise werden CpG-ODN im Blut durch körpereigene Nukleasen rasch abgebaut, bevor sie eine umfassende systemische Immunreaktion initiieren können. Die Stabilität der CpG-ODN kann offenbar durch Hitzeinaktivierung der Blutbestandteile erhöht werden (s. Abb. 16D). Dies deutet darauf hin, dass hitzelabile Enzyme aus dem Blut, möglicherweise Nukleasen, CpG-ODN rasch inaktivieren. Diese Erkenntnisse haben möglicherweise wichtige Konsequenzen für die Auswahl eines geeigneten Applikationsweges von CpG-basierten Vakzinen sowie für die Entwicklung galenischer CpG-Zubereitungen.

Bisher gab es keinen *in vivo*-Serumparameter, mit dessen Hilfe die immunstimulatorische Wirkung von CpG-ODN nach intramuskulärer CpG-Impfung auf systemischer Ebene überprüft werden konnte. IFN- $\alpha$  war im Plasma der CpG-geimpften Affen nicht nachweisbar. Dafür waren wahrscheinlich (1) die geringe Kreuzreaktivität des humanen IFN- $\alpha$ -ELISA und (2) die hemmende Wirkung von Plasmabestandteilen verantwortlich. Aus *in vitro*-Experimenten ist bekannt, dass

CpG-Stimulation die Produktion des Chemokins IP-10 induziert (Krug, 2001b; Blackwell, 2003). Der Großteil von IP-10 wird nicht von PDC selbst produziert, sondern von myeloiden Zellen. Das von PDC auf CpG-Stimulation produzierte IFN- $\alpha$  regt z.B. Monozyten zur Produktion von IP-10 an (Blackwell, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals demonstriert, dass die intramuskuläre CpG-Gabe mit einem systemischen Anstieg des Serum-IP-10 korreliert (Abb. 15B). Dieser Befund ist umso wertvoller, wenn man bedenkt, dass die CpG-Wirkung in Gegenwart von Blutbestandteilen inhibiert wird und auch die IP-10-Produktion in Vollblut im Vergleich zu Kulturmedium stark reduziert ist (s. Abb. 16B). Offenbar ist IP-10 ein sehr sensibler Messparameter, d.h. bereits geringe CpG-Mengen reichen aus, um gut messbare IP-10-Werte zu induzieren. Zukünftig könnte die Bestimmung des Plasma-IP-10 zur Überprüfung der immunstimulatorischen Aktivität therapeutisch eingesetzter CpG-ODN genutzt werden.

#### 4.2.4 Die Rolle der PDC in der antiviralen Immunabwehr und CpG-basierte Therapieansätze gegen SIV bzw. HIV

##### *Antivirale Wirkung CpG-induzierter löslicher Faktoren*

Das *Simian immunodeficiency virus* im Rhesusaffen ist derzeit das beste HIV-Modell in einem nicht-humanen Primaten (Johnson, 1992). Vorbereitend für die Entwicklung einer CpG-basierten Vakzine gegen HIV sollte untersucht werden, ob die beiden CpG-Typen eine direkte antivirale Wirkung gegenüber SIV haben und welches der beiden ODN-Typen (A oder B) hierbei potenter ist. Beide CpG-Typen konnten die SIV-Infektion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen maßgeblich reduzieren (Abb. 17). Kulturüberstände von CpG-B schützten T-Zellen überraschenderweise noch effektiver vor einer Infektion mit SIV als Überstände des Typ-I-IFN induzierenden ODN 2216 (CpG-A) oder rekombinantes IFN- $\alpha$ . Folglich tragen neben Typ-I-IFN noch andere CpG-induzierte lösliche Faktoren - Zytokine und/oder Chemokine - zu der antiviralen Wirkung von CpG-ODN bei. Mögliche Mechanismen des in dieser Arbeit beobachteten antiviralen Effekts von CpG-Kulturüberständen könnten sein: (i) Direkte Hemmung der Virusreplikation (durch Zytokine oder durch Initiation bestimmter Signalkaskaden); (ii) Hemmung des Virus-Eintritts in die T-Zelle (z.B. durch Herunterregulation von Chemokin-Rezeptoren auf der T-Zelle); (iii) Stärkung der wirtseigenen Abwehrmechanismen (Induktion von Wachstums-/Überlebensfaktoren bzw. Zytokinen und Chemokinen in der T-Zelle); (iv) Kompetitive Hemmung des Viruseintritts über Chemokinrezeptoren durch Chemokine (z.B. Rantes, wird von PDC produziert (Fong, 2002) und bindet an CCR5).

Die plasmazytoide DC ist die primäre Zielzelle von CpG-DNA im Vertebraten. Da PDC bei viraler Infektion bzw. CpG-Stimulation hohe Mengen an inflammatorischen und antiviralen Substanzen

produzieren, kann man annehmen, dass die CpG-induzierten löslichen Faktoren, die in dem vorliegenden Modell die Replikation von SIV inhibierten, von der PDC stammen.

### *Rolle der PDC bei Virusinfektionen*

Die PDC wurde erst vor kurzem als ein neuer dendritischer Zelltyp identifiziert, der wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in der antiviralen Immunabwehr spielt. PDC sind für die Produktion hoher Mengen der antiviralen Zytokine IFN- $\alpha/\beta$  bei viraler Infektion verantwortlich (Fitzgerald-Bocarsly, 1993; Cella, 1999; Siegal, 1999). PDC exprimieren nur ein restringiertes Repertoire an Toll-like Rezeptoren, darunter TLR9, wodurch sie mikrobielle CpG-Motive erkennen (Krug, 2001b). Bisher ist CpG-DNA das einzig definierte molekulare Muster, das die PDC stimuliert. Eine aktuelle Veröffentlichung von der Arbeitsgruppe um Ruslan Medzhitov demonstriert, dass Herpes simplex Virus 2 (HSV-2) über die in der viralen DNA enthaltenen CpG-Motive via TLR9 von murinen PDC erkannt wird (Lund, 2003). Diese Daten weisen darauf hin, dass DNA-Viren hauptsächlich durch die Erkennung von CpG-Motiven in der viralen DNA durch PDC detektiert werden. Synthetische CpG-ODN imitieren in PDC offenbar einen Virusstimulus und induzieren als Konsequenz maximale Mengen an IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  in PDC (Krug, 2001a).

### *Dysfunktion der PDC bei HIV-Infektion*

In der Literatur gibt es Berichte, dass es während einer HIV-Infektion zu einem progressiven Verlust der beiden distinkten DC-Typen, MDC und PDC, kommt (Donaghy, 2001; Feldman, 2001; Soumelis, 2001; Chehimi, 2002; Barron, 2003). PDC von HIV-Patienten produzieren bei Virus-Stimulation *in vitro* weniger IFN- $\alpha$  und haben in *Mixed Lymphocyte Reactions* (MLR) verminderte T-Zell-stimulatorische Eigenschaften im Vergleich zu PDC gesunder Spender (Feldman, 2001; Chehimi, 2002; Donaghy, 2003). Bei intrazellulärer Anfärbung von IFN- $\alpha$  in PDC nach *in vitro*-Stimulation mit HSV-1 wurde nachgewiesen, dass PDC von HIV-Patienten auf Einzelzellebene weniger IFN- $\alpha$  produzieren als PDC gesunder Spender (Feldman, 2001). Demnach basiert die verminderte IFN- $\alpha$ -Produktion in HIV-Patienten auf (i) einem Frequenzverlust und (ii) einer Dysfunktion der PDC. Neben dem CD4 Rezeptor exprimieren PDC auch die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4, über die HIV in eine Zelle eintritt (Barron, 2003). Den neusten Arbeiten zufolge können PDC von HIV infiziert werden (Patterson, 2001; Soumelis, 2002; Donaghy, 2003). Die Berichte aus der Literatur lassen vermuten, dass HIV-infizierte PDC wegen der verminderten Fähigkeit, IFN- $\alpha$  zu produzieren sowohl ihre direkten antiviralen Eigenschaften als auch ihre T-Zell-stimulatorischen Fähigkeiten verlieren. Verschiedene Studien zeigen, dass rekombinantes IFN- $\alpha$  die Replikation von Retroviren, einschließlich HIV und SIV, *in vitro* (Agy, 1995) und die Replikation von HIV *in vivo* (Mildvan, 1996; Lapenta, 1999; Haas, 2000; Emilie, 2001; Hatzakis, 2001) hemmt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die reduzierte IFN- $\alpha$ -Produktion der PDC von

AIDS-Patienten mit Krankheitsprogression und der Entwicklung opportunistischer Infektionen korreliert (Soumelis, 2002; Barron, 2003).

### *Einsatzmöglichkeiten von CpG-ODN bei SIV/HIV*

Viren entwickeln vielseitige Mechanismen, um einer antiviralen Immunantwort des Wirtes zu entkommen. Dabei unterdrücken Viren z.B. die Erkennungsmechanismen oder Signalwege, die zur IFN-Produktion bzw. zur biologischen Aktivität von IFN führen (z.B. PKR = *double-stranded RNA-activated protein kinase*). In HIV-Patienten kommt es zu Frequenz- und Funktionsverlusten der PDC, was wahrscheinlich zu den gravierenden Immundefekten dieser Patienten beiträgt. Indem HIV PDC infiziert und deren Funktion schwächt, inhibiert HIV den Hauptspieler der antiviralen Immunabwehr. Die Erhaltung bzw. die Verstärkung der PDC-Funktion durch CpG-ODN könnte umgekehrt eine Abwehr gegen HIV bewirken. Nach dem bisherigen Erkenntnisstand ergeben sich folgende Ansatzmöglichkeiten für CpG-ODN in der HIV-Therapie:

(1) *Direkte antivirale Wirkung*: CpG-induzierte lösliche Faktoren konnten T-Zellen vor einer Infektion mit SIV schützen. Rekombinantes IFN- $\alpha$  hemmt die Replikation von SIV und HIV *in vitro* und die Replikation von HIV *in vivo*. CpG-ODN können daher wahrscheinlich auch die Infektion der PDC mit SIV/HIV hemmen und somit Frequenz und Funktion der PDC in HIV-Patienten erhalten. Dadurch würde die Produktion von IFN- $\alpha$  und weiterer antiviraler Faktoren in PDC von HIV-Patienten wiederhergestellt bzw. bewahrt. Die direkte antivirale Wirkung der von PDC auf CpG-Stimulation produzierten löslichen Faktoren könnte auch die Replikation von anderen opportunistischen Viren in HIV-Patienten hemmen (z.B. HHV-8 (Humaner Herpes Virus 8), CMV).

(2) *Verbesserung des Impferfolges bei immunsupprimierten Patienten*: CpG-ODN können den Impferfolg einer Vakzine (Responderrate) in immunsupprimierten Patienten verbessern. In einer von der Firma *Coley* durchgeführten Vakzinierungsstudie wurden 38 HIV-Patienten mit einer Alum-haltigen Hepatitis B-Vakzine (Engerix B) geimpft. Die Hälfte der Patienten erhielt zusätzlich zu Engerix B CpG-ODN (CpG 7909). 89% der HIV-Patienten aus der CpG-Gruppe (Eng.B + CpG) entwickelten protektive anti-HBs-AK-Titer ( $\geq 10$  mIU/ml), dagegen nur 42% der HIV-Patienten aus der Kontroll-Gruppe (Eng.B w/o CpG). Die Antikörpertiter der HIV-Patienten aus der CpG-Gruppe waren zudem signifikant höher als die der Kontrollgruppe (Presseinformation der Fa. *Coley Pharmaceutical Group*, USA v. 13.02.2003).

(3) *Prophylaktische Vakzine gegen HIV*: Um die Ausbreitung von AIDS bekämpfen zu können, werden effektive Vakzinestrategien gegen HIV gesucht. Inzwischen geht man davon aus, dass nur eine ausreichend starke zelluläre Immunität, insbesondere HIV-spezifische CD8<sup>+</sup> CTL, HIV unter Kontrolle halten können (Letvin, 2002). Der erste Teil dieser Arbeit untersucht den Mechanismus

der CpG-induzierten Verstärkung einer Ag-spezifischen T-Zellantwort. CpG-aktivierte PDC verstärken durch lösliche Faktoren, v.a. Typ-I-IFN, und durch direkten Zellkontakt mit voraktivierten T-Zellen Ag-unabhängig die spezifische T-Zell-Aktivierung (Boost). Damit leisten CpG-aktivierte PDC optimale Adjuvaneigenschaften, um eine T-Zellantwort auf ein bestimmtes Immunogen zu verstärken. Verthelyi et al. zeigten erstmals in einem Primatenmodell, dass CpG-A in Kombination mit einem starken T-Zell-Antigen die Bildung einer Th1-Immunantwort sehr effizient verstärken kann (Verthelyi, 2002). Diese Daten stimmen optimistisch, dass eine CpG-basierte Vakzine gegen SIV bzw. HIV die Entwicklung spezifischer CTL gegen SIV/HIV fördern könnte.

(4) *Therapeutische Vakzinierung gegen HIV*: Zusätzlich zu einer prophylaktischen Vakzine könnte man versuchen, eine CpG-basierte therapeutische Vakzine gegen HIV zu entwickeln, um bereits HIV-infizierte Patienten therapieren zu können. Für den Einsatz von CpG-ODN als Adjuvans bei einer therapeutischen HIV-Vakzine sprechen (i) die antivirale Aktivität CpG-induzierter löslicher Faktoren gegenüber SIV sowie (ii) die Aktivierung wichtiger Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems durch CpG-ODN, insbesondere spezifischer Effektor-T-Zellen. Diese Eigenschaften einer CpG-basierten therapeutischen HIV-Vakzine könnten bewirken, dass (i) Überleben und Funktion der PDC und anderer wichtiger Immunzellen erhalten und (ii) die Entwicklung einer HIV-spezifischen T-Zell-Immunität verstärkt werden.

Damit eröffnen sich vielversprechende immuntherapeutische Ansätze für CpG-ODN bei SIV- bzw. HIV-Infektionen.

### 4.3 Zukunft einer CpG- und $\alpha$ -GalCer-basierten Vakzine

#### *CpG-ODN: Verbesserte Adjuvanseigenschaften gegenüber dem Standard Alum*

Bis heute ist Alum (Aluminiumhydroxid) weltweit das einzig zugelassene Adjuvans. Beide distinkten CpG-Typen, A und B, verstärkten in dieser Arbeit die spezifische IgG-Antwort auf eine Alum-haltige Hepatitis B-Vakzine. CpG-ODN wurden von den Affen in der vorliegenden Studie und auch in ersten klinischen Studien sehr gut vertragen (Verthelyi, 2002). Die Ergebnisse der bisher durchgeführten Rhesusaffen-Studien (diese Arbeit, Fa. *Coley Pharmaceutical Group* (Wellesley, MA, USA), (Verthelyi, 2002)) sind wahrscheinlich auch für die Hepatitis B-Impfung im Menschen von Bedeutung: CpG-ODN könnten (1) die Anzahl der Impfungen reduzieren, die notwendig sind, um einen Impfschutz zu erreichen und (2) eine Immunisierung von Non-Respondern ermöglichen. Ad (1): Die Reduktion der Anzahl an Vakzinierungen hat aus sozialökonomischen Gründen hohe Bedeutung. Eine Immunisierung der Bevölkerung könnte damit effektiv, kostengünstiger und so schnell wie möglich durchgeführt werden. Ad (2): Bei jungen, gesunden Erwachsenen liegt der Non-Responder-Anteil nach dreimaliger HBs-Impfung bei <5% (Davis, 2000). Andere Non-Responder sind immunsupprimierte Patienten. Die kürzlich von der Firma *Coley* durchgeführte Vakzinierungsstudie mit HIV-Patienten demonstriert, dass CpG-ODN in Kombination mit einer Alum-haltigen Hepatitis B-Vakzine die Immunisierung immunsupprimierter Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Alum-haltige HBs-Vakzine ohne CpG) ermöglichen bzw. maßgeblich verstärken (Presseinformation der Fa. *Coley Pharmaceutical Group*, USA v. 13.02.2003).

Gerade für die Entwicklung neuer Vakzine gegen heutzutage schnell kursierende, schwer behandelbare Epidemien (HIV, SARS (*Severe acute respiratory syndrome*)) ist die Einführung eines Adjuvans mit verbesserten T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften von großem Interesse. Bis vor kurzem gab es nur Hinweise aus murinen Studien, dass CpG-ODN die Entwicklung einer Th1-Immunantwort inklusive spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten verstärken (Maurer, 2002; Miconnet, 2002). Wegen der speziesspezifischen Unterschiede in der Wirkung von CpG-ODN in Maus und Mensch konnte man von den murinen Daten nicht auf die CpG-Wirkung im Primaten schließen. Die Studie von Verthelyi et al. bestätigt erstmals in einem Primatenmodell (Rhesusaffe), dass CpG-ODN in Kombination mit einem T-Zell-Antigen die Entwicklung einer Th1-gerichteten Immunantwort verstärken können (Verthelyi, 2002).



### *Kombinierter Einsatz von $\alpha$ -GalCer und CpG-ODN in der Immuntherapie*

Bisher wurde das NKT-Zell-spezifische Antigen  $\alpha$ -GalCer nur in Mausstudien eingesetzt. In der Maus zeigte der Einsatz von  $\alpha$ -GalCer in der Krebstherapie, bei Autoimmunerkrankungen und bei der Behandlung von Infektionen sehr vielversprechende Ergebnisse (s. 1.6.4 u. 1.6.6). Für den klinischen Einsatz von  $\alpha$ -GalCer erscheint die Kombination mit einem Th1-Adjuvans wie CpG-ODN aus verschiedenen Gründen sinnvoll: (i) Im Menschen kommen im Vergleich zu der Maus wesentlich geringere prozentuale Anteile von NKT-Zellen vor (Biron, 2001). Durch Kombination von  $\alpha$ -GalCer mit CpG-ODN könnte man die Antigen-spezifische Aktivierung der NKT-Zellen verstärken, so dass trotz der sehr niedrigen NKT-Zell-Frequenz eine effektive Immunantwort induziert wird; (ii) Studien in der Maus haben gezeigt, dass hohe Dosen an  $\alpha$ -GalCer hepatotoxisch wirken (Osman, 2000). Durch Kombination mit einem Adjuvans, wie CpG-ODN, könnte die  $\alpha$ -GalCer-Dosis so gering wie möglich gehalten werden, um die Gefahr toxischer Nebeneffekte zu minimieren; (iii) als Th0-Zellen können NKT-Zellen je nach umgebendem Milieu und Art des Stimulus in Th1- oder Th2-Richtung differenzieren (Godfrey, 2000). Diese Eigenschaft der NKT-Zellen eröffnet einerseits sehr breite immuntherapeutische Eingriffsmöglichkeiten, birgt andererseits jedoch die Gefahr, dass NKT-Zellen nicht immer in die erwünschte Richtung aktiviert werden. So gibt es in der Literatur Berichte, dass NKT-Zellen die Entwicklung von Autoimmungeschehen fördern bzw. eine antitumorale Immunantwort hemmen können (Kaneko, 2000; Takeda, 2000; Terabe, 2000). CpG-ODN induzierte in Kombination mit  $\alpha$ -GalCer eine starke Th1-gerichtete Aktivierung der NKT-Zellen. Durch die Kombination von  $\alpha$ -GalCer mit CpG-ODN würde eine  $\alpha$ -GalCer-basierte Immuntherapie demnach gut steuerbar und könnte eine effizientere Th1-gerichtete Immunantwort gegen Tumore und intrazelluläre Erreger induzieren.

### *Aktivierung von dendritischen Zellen mithilfe von Immunadjuvantien*

Das effektive Priming von Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten mithilfe einer prophylaktischen oder therapeutischen Vakzine ist eine der großen Herausforderungen in der immunologischen Forschung. Ag-spezifische CTL können körpereigene Zellen - Tumorzellen oder Zellen, die mit einem Virus oder intrazellulärem Bakterium infiziert sind - eliminieren. Die Effektivität von Adjuvantien, eine spezifische T-Zellantwort zu fördern, hängt wahrscheinlich ganz wesentlich davon ab, ob diese die Aktivierung und Ausreifung von DC induzieren und somit das Priming von T-Zellen verstärken können. CpG-ODN und  $\alpha$ -GalCer sind jeweils effektive Th1-Adjuvantien, die die Entwicklung Ag-spezifischer CTL beschleunigen (Gonzalez-Aseguinolaza, 2002; Maurer, 2002; Miconnet, 2002). Obwohl sich die Erkennungsmechanismen von  $\alpha$ -GalCer und CpG-DNA im Vertebraten-Immunsystem grundlegend unterscheiden, sind die anschließenden Effekte der beiden Immunadjuvantien sehr ähnlich: Beide aktivieren DC, wobei CpG-DNA direkt über TLR9 von PDC erkannt wird;  $\alpha$ -GalCer stimuliert dagegen primär MDC über zelluläre

Interaktion zwischen  $\alpha$ -GalCer-aktivierten NKT-Zellen und MDC. Nach Stimulation mit CpG-DNA und  $\alpha$ -GalCer führt die DC-Aktivierung im weiteren Verlauf der Immunantwort zu einer Verstärkung der spezifischen zellulären und humoralen Immunität (Gonzalez-Aseguinolaza, 2002; Verthelyi, 2002). Diese Arbeit zeigt, dass durch Kombination beider Substanzen *in vitro* eine Th1-gerichtete Immunantwort maßgeblich verstärkt wird und beschreibt die molekularen Mechanismen, die dem Synergismus beider Adjuvantien zugrunde liegen. Damit bildet diese Arbeit die rationale Basis für den kombinierten Einsatz von CpG-ODN und  $\alpha$ -GalCer zur Verstärkung einer Th1-gerichteten Immunantwort. In *in vitro*- und *in vivo*-Modellen muss nun die Effektivität dieser Adjuvanskombination überprüft und hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Ag-spezifische CTL zu induzieren, weiter untersucht werden. Nach den Erkenntnissen aus dieser Arbeit eröffnet die Adjuvanskombination CpG-ODN/ $\alpha$ -GalCer vielversprechende Möglichkeiten für die Entwicklung von prophylaktischen und/oder therapeutischen Vakzine gegen intrazelluläre Erreger - wie Viren und Bakterien - sowie zur Bekämpfung von Tumoren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

CpG-haltige DNA wird in Vertebraten von Zellen des angeborenen Immunsystems als molekulares Muster eines mikrobiellen Erregers erkannt und löst als Konsequenz eine Immunreaktion aus. In Vakzinierungsstudien in Mäusen und Primaten verstärkten synthetische CpG-haltige Oligonukleotide (CpG-ODN) als Adjuvans die spezifische humorale und zelluläre Immunität. Natürliche Killer T(NKT)-Zellen sind voraktivierte Memory-T-Zellen mit angeborener Spezifität für das CD1d-restringierte Glykolipid-Antigen  $\alpha$ -Galaktosylceramid ( $\alpha$ -GalCer). Ähnlich wie Natürliche Killer-Zellen werden NKT-Zellen in der Initialphase einer Immunantwort aktiviert und induzieren durch Zytokinausschüttung sekundär die Aktivierung anderer Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. In einer murinen Vakzinierungsstudie war berichtet worden, dass  $\alpha$ -GalCer die spezifische zelluläre Immunantwort auf eine Malaria-Vakzine verstärkt. Vorbereitend für die Kombination von CpG-ODN und  $\alpha$ -GalCer zur Verstärkung der spezifischen zellulären Immunität wurde in *Teil I* dieser Arbeit die Wirkung der gleichzeitigen Gabe beider Adjuvantien anhand der Aktivierung humaner NKT-Zellen untersucht. Ziel dabei war es auch, grundlegende Erkenntnisse über die Mechanismen der Interaktion zwischen plasmazytoiden DC und T-Zellen zu gewinnen.

Als voraktivierte Memory-T-Zellen wurden NKT-Zellen innerhalb von PBMC bereits ohne Anwesenheit ihres spezifischen Antigens durch CpG-ODN stimuliert. Kostimulation mit CpG-ODN plus  $\alpha$ -GalCer verstärkte synergistisch die Effektorfunktion von NKT-Zellen und ihre Differenzierung in Richtung Th1. Der Typ-I-Interferon induzierende ODN-Typ CpG-A aktivierte NKT-Zellen stärker als CpG-B. Experimente zur Klärung des Mechanismus, der dem Synergismus zwischen CpG-ODN und  $\alpha$ -GalCer zu Grunde liegt, ergaben, dass plasmazytoide DC, die über Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) CpG-Motive direkt erkennen, die CpG-vermittelte Aktivierung auf NKT-Zellen übertragen. Nur myeloide DC können NKT-Zellen im peripheren Blut das Glykolipid-Antigen  $\alpha$ -GalCer CD1d-gebunden präsentieren. Folglich ist die CpG-ODN erkennende Zelle (plasmazytoide DC) nicht mit der  $\alpha$ -GalCer präsentierenden Zelle (myeloide DC) identisch. Die CpG-vermittelte Aktivierung von NKT-Zellen war abhängig von Typ-I-Interferon. Die Steigerung der IFN- $\gamma$ -Produktion in NKT-Zellen durch CpG-Stimulation benötigte jedoch zusätzlich zu Typ-I-Interferon noch einen weiteren Stimulus von der plasmazytoiden DC, der nicht in Form löslicher CpG-induzierter Kulturüberstände oder durch eine semipermeable Membran in Transwells vermittelt werden konnte. Dies macht wahrscheinlich, dass plasmazytoide DC die Aktivierung der NKT-Zellen über Typ-I-Interferon und einen Zellkontakt-abhängigen Mechanismus Antigen-unabhängig steigern.

Aufgrund der Spezies-spezifischen Unterschiede zwischen Maus und Mensch hinsichtlich der TLR9-Expression und der Aktivität von CpG-ODN können CpG-ODN mit optimal immunstimulatorischer Aktivität im Menschen (sog. *humane* CpG-ODN) nicht in einfachen Tiermodellen (Maus, Ratte) ausgetestet werden. Daher wurde in *Teil II* dieser Arbeit zunächst untersucht, ob die zwei verschiedenen CpG-Typen A und B *in vitro* auf Rhesusaffen-Immunzellen vergleichbar immunstimulatorisch wirken wie auf humane Immunzellen. Darüber hinaus sollte in einer Vakzinierungsstudie in Rhesusaffen *in vivo* untersucht werden, ob beide CpG-Typen die Immunisierung durch eine Hepatitis B-Vakzine verstärken. Vorbereitend für die Entwicklung einer CpG-basierten Vakzine gegen *Simian immunodeficiency virus* (SIV), einem HIV-Modell im Rhesusaffen, wurde untersucht, ob die von Rhesus-Immunzellen bei CpG-Stimulation produzierten löslichen Faktoren T-Zellen *in vitro* vor einer Infektion mit SIV schützen.

CpG-A und -B zeigten jeweils eine starke immunstimulatorische Wirkung auf periphere Blutlymphozyten von Rhesusaffen. Das in Rhesus-Immunzellen durch CpG-ODN induzierte Aktivierungsmuster (IFN- $\alpha$ , IL-6, IP-10, CD80, CD86 etc.) entsprach dem im humanen System und wies darauf hin, dass der Rhesusaffe dieselben CpG-Zielzellen wie der Mensch besitzt (B-Zelle und plasmazytoide DC). Erstmals wurden in dieser Arbeit plasmazytoide DC im peripheren Blut von Rhesusaffen nachgewiesen. Frequenz und *in vitro*-Funktionen von plasmazytoiden Rhesus-DC entsprachen denen humaner plasmazytoider DC. Trotz unterschiedlicher immunologischer Eigenschaften verstärkten beide CpG-Typen A und B als Adjuvantien im Rhesusaffen *in vivo* die spezifische humorale Immunantwort auf eine Alum-haltige Hepatitis B-Vakzine. Die systemische Immunstimulation durch CpG-ODN spiegelte sich *in vivo* in einem kurzfristigen Anstieg des Plasma-IP-10 (*interferon-inducible protein-10*) in den CpG-geimpften Affen wider. Dennoch wurde weder in den CpG-geimpften Affen noch in den Kontrolltieren eine spezifische T-Zellantwort gegen Hepatitis B-Virus induziert.

Kulturüberstände von CpG-stimulierten Rhesus-Immunzellen und rekombinantes IFN- $\alpha$  inhibierten die Infektion einer CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie mit SIV. CpG-B-Kulturüberstände schützten T-Zellen überraschenderweise noch effektiver vor einer Infektion als rekombinantes IFN- $\alpha$  oder Überstände von dem stark Typ-I-Interferon induzierenden CpG-A. Folglich sind in dem vorliegenden Modell neben IFN- $\alpha$  vermutlich noch andere CpG-induzierte lösliche Faktoren (Zytokine, Chemokine) an der Hemmung der Infektion durch SIV beteiligt.

*Teil I* dieser Arbeit bildet die rationale Basis für den kombinierten Einsatz von CpG-ODN und  $\alpha$ -GalCer zur Verstärkung einer Th1-gerichteten Immunantwort. In *in vitro*- und *in vivo*-Modellen muss nun die Effektivität dieser Adjuvanskombination überprüft und hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen zu induzieren, weiter untersucht werden. Darüber hinaus trägt dieser Teil der Arbeit zu einem neuen Verständnis der plasmazytoiden DC als

speziellem DC-Subtyp bei, der innerhalb des Immunsystems die Aktivierung von Memory-T-Zellen Antigen-unabhängig regulieren kann. *Teil II* dieser Arbeit bestätigt anhand von *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen, dass der Rhesusaffe ein ideales Primatenmodell für präklinische Studien mit *humanen* CpG-ODN ist. Im Rahmen einer Vakzinierungsstudie im Rhesusaffen wurde nachgewiesen, dass CpG-ODN eine spezifische Immunisierung im Primaten maßgeblich verstärken können. Mit dem Nachweis, dass CpG-induzierte lösliche Faktoren die Infektion von T-Zellen mit SIV effektiv hemmen, eröffnen sich vielversprechende Perspektiven für die Entwicklung einer CpG-basierten prophylaktischen und/oder therapeutischen Vakzine gegen SIV und HIV.

## 6 LITERATUR

- Adachi, Y., H. Koseki, M. Zijlstra and M. Taniguchi. 1995. Positive selection of invariant V alpha 14+ T cells by non-major histocompatibility complex-encoded class I-like molecules expressed on bone marrow-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(4): 1200-4.
- Agy, M. B., R. L. Acker, C. H. Sherbert and M. G. Katze. 1995. Interferon treatment inhibits virus replication in HIV-1- and SIV-infected CD4+ T-cell lines by distinct mechanisms: evidence for decreased stability and aberrant processing of HIV-1 proteins. *Virology* 214(2): 379-86.
- Akira, S., K. Takeda and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2(8): 675-80.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413(6857): 732-8.
- Anderson, K. V. 2000. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 12: 13-9.
- Apostolou, I., Y. Takahama, C. Belmant, T. Kawano, M. Huerre, G. Marchal, J. Cui, M. Taniguchi, H. Nakauchi, J. J. Fournie, P. Kourilsky and G. Gachelin. 1999. Murine natural killer T(NKT) cells contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9): 5141-6.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.
- Barron, M. A., N. Blyveis, B. E. Palmer, S. MaWhinney and C. C. Wilson. 2003. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* 187(1): 26-37.
- Bauer, M., V. Redecke, J. W. Ellwart, B. Scherer, J. P. Kremer, H. Wagner and G. B. Lipford. 2001. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol* 166(8): 5000-7.
- Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier and T. Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285(5428): 727-9.
- Belvin, M. P. and K. V. Anderson. 1996. A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 393-416.
- Bendelac, A., N. Killeen, D. R. Littman and R. H. Schwartz. 1994. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* 263(5154): 1774-8.
- Bendelac, A., O. Lantz, M. E. Quimby, J. W. Yewdell, J. R. Bennink and R. R. Brutkiewicz. 1995. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 268(5212): 863-5.
- Bendelac, A., M. N. Rivera, S. H. Park and J. H. Roark. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 15: 535-62.
- Billiau, A. and P. Matthys. 2001. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 70(6): 849-60.
- Biron, C. A. 1998. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol* 10(5): 383-90.
- Biron, C. A. 2001. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* 14(6): 661-4.

- Biron, C. A. and L. Brossay. 2001. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol* 13(4): 458-64.
- Blackwell, S. E. and A. M. Krieg. 2003. CpG-A-induced monocyte IFN-gamma-inducible protein-10 production is regulated by plasmacytoid dendritic cell-derived IFN-alpha. *J Immunol* 170(8): 4061-8.
- Brossay, L., M. Chioda, N. Burdin, Y. Koezuka, G. Casorati, P. Dellabona and M. Kronenberg. 1998. CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med* 188(8): 1521-8.
- Campos, M. A., I. C. Almeida, O. Takeuchi, S. Akira, E. P. Valente, D. O. Procopio, L. R. Travassos, J. A. Smith, D. T. Golenbock and R. T. Gazzinelli. 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167(1): 416-23.
- Canchis, P. W., A. K. Bhan, S. B. Landau, L. Yang, S. P. Balk and R. S. Blumberg. 1993. Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. *Immunology* 80(4): 561-5.
- Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury and J. Demengeot. 2003. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 197(4): 403-11.
- Carnaud, C., D. Lee, O. Donnars, S. H. Park, A. Beavis, Y. Koezuka and A. Bendelac. 1999. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* 163(9): 4647-50.
- Cella, M., F. Facchetti, A. Lanzavecchia and M. Colonna. 2000. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 1(4): 305-310.
- Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia and M. Colonna. 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5: 919-23.
- Chakrabarti, L., M. Guyader, M. Alizon, M. D. Daniel, R. C. Desrosiers, P. Tiollais and P. Sonigo. 1987. Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature* 328(6130): 543-7.
- Chehimi, J., D. E. Campbell, L. Azzoni, D. Bacheller, E. Papasavvas, G. Jerandi, K. Mounzer, J. Kostman, G. Trinchieri and L. J. Montaner. 2002. Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol* 168(9): 4796-801.
- Chehimi, J., S. E. Starr, H. Kawashima, D. S. Miller, G. Trinchieri, B. Perussia and S. Bandyopadhyay. 1989. Dendritic cells and IFN-alpha-producing cells are two functionally distinct non-B, non-monocytic HLA-DR+ cell subsets in human peripheral blood. *Immunology* 68(4): 488-90.
- Chen, A. I., A. J. McAdam, J. E. Buhlmann, S. Scott, M. L. Lupper, Jr., E. A. Greenfield, P. R. Baum, W. C. Fanslow, D. M. Calderhead, G. J. Freeman and A. H. Sharpe. 1999. Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions. *Immunity* 11(6): 689-98.
- Chen, Y. H., N. M. Chiu, M. Mandal, N. Wang and C. R. Wang. 1997. Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity* 6(4): 459-67.
- Chu, R. S., O. S. Targoni, A. M. Krieg, P. V. Lehmann and C. V. Harding. 1997. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 186(10): 1623-31.

- Coley, W. B. 1991. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop* 262: 3-11.
- Colgan, S. P., R. S. Pitman, T. Nagaishi, A. Mizoguchi, E. Mizoguchi, L. F. Mayer, L. Shao, R. B. Sartor, J. R. Subjeck and R. S. Blumberg. 2003. Intestinal heat shock protein 110 regulates expression of CD1d on intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 112(5): 745-54.
- Colonna, M., A. Krug and M. Cella. 2002. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr Opin Immunol* 14(3): 373-9.
- Cui, J., T. Shin, T. Kawano, H. Sato, E. Kondo, I. Toura, Y. Kaneko, H. Koseki, M. Kanno and M. Taniguchi. 1997. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278(5343): 1623-6.
- D'Andrea, A., D. Goux, C. De Lalla, Y. Koezuka, D. Montagna, A. Moretta, P. Dellabona, G. Casorati and S. Abrignani. 2000. Neonatal invariant Valpha24+ NKT lymphocytes are activated memory cells. *Eur J Immunol* 30(6): 1544-50.
- Daniel, M. D., N. W. King, N. L. Letvin, R. D. Hunt, P. K. Sehgal and R. C. Desrosiers. 1984. A new type D retrovirus isolated from macaques with an immunodeficiency syndrome. *Science* 223(4636): 602-5.
- Das, H., V. Groh, C. Kuijl, M. Sugita, C. T. Morita, T. Spies and J. F. Bukowski. 2001. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 15(1): 83-93.
- Dascher, C. C. and M. B. Brenner. 2003. CD1 antigen presentation and infectious disease. *Contrib Microbiol* 10: 164-82.
- Davis, H. L., I. Suparto, R. Weeratna, Jumintarto, D. Iskandriati, S. Chamzah, A. Ma'ruf, C. Nente, D. Pawitri, A. M. Krieg, Heriyanto, W. Smits and D. Sajuthi. 2000. CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* 18(18): 1920-4.
- Davis, H. L., R. Weeratna, T. J. Waldschmidt, L. Tygrett, J. Schorr, A. M. Krieg and R. Weeranta. 1998. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 160(2): 870-6.
- Dellabona, P., E. Padovan, G. Casorati, M. Brockhaus and A. Lanzavecchia. 1994. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med* 180(3): 1171-6.
- Denkers, E. Y., T. Schariton-Kersten, S. Barbieri, P. Caspar and A. Sher. 1996. A role for CD4+ NK1.1+ T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of CD8+ effector function against intracellular infection. *J Exp Med* 184(1): 131-9.
- Donaghy, H., B. Gazzard, F. Gotch and S. Patterson. 2003. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* 101(11): 4505-11.
- Donaghy, H., A. Pozniak, B. Gazzard, N. Qazi, J. Gilmour, F. Gotch and S. Patterson. 2001. Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 98(8): 2574-6.
- Dzionek, A., Y. Sohma, J. Nagafune, M. Cella, M. Colonna, F. Facchetti, G. Gunther, I. Johnston, A. Lanzavecchia, T. Nagasaka, T. Okada, W. Vermi, G. Winkels, T. Yamamoto, M. Zysk, Y. Yamaguchi and J. Schmitz. 2001. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 194(12): 1823-34.
- Elkins, K. L., T. R. Rhinehart-Jones, S. Stibitz, J. S. Conover and D. M. Klinman. 1999. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol* 162(4): 2291-8.



- Emilie, D., M. Burgard, C. Lascoux-Combe, M. Laughlin, R. Krzysiek, C. Pignon, A. Rudent, J. M. Molina, J. M. Livrozet, F. Souala, G. Chene, L. Grangeot-Keros, P. Galanaud, D. Sereni and C. Rouzioux. 2001. Early control of HIV replication in primary HIV-1 infection treated with antiretroviral drugs and pegylated IFN alpha: results from the Primoferon A (ANRS 086) Study. *Aids* 15(11): 1435-7.
- Exley, M., J. Garcia, S. P. Balk and S. Porcelli. 1997. Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J Exp Med* 186(1): 109-20.
- Exley, M., J. Garcia, S. B. Wilson, F. Spada, D. Gerdes, S. M. Tahir, K. T. Patton, R. S. Blumberg, S. Porcelli, A. Chott and S. P. Balk. 2000. CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes. *Immunology* 100(1): 37-47.
- Feldman, S., D. Stein, S. Amrute, T. Denny, Z. Garcia, P. Kloser, Y. Sun, N. Megjugorac and P. Fitzgerald-Bocarsly. 2001. Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin Immunol* 101(2): 201-10.
- Fitzgerald-Bocarsly, P. 1993. Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol Ther* 60(1): 39-62.
- Fong, L., M. Mengozzi, N. W. Abbey, B. G. Herndier and E. G. Engleman. 2002. Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation. *J Virol* 76(21): 11033-41.
- Fonteneau, J. F., M. Gilliet, M. Larsson, I. Dasilva, C. Munz, Y. J. Liu and N. Bhardwaj. 2003. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2: 2.
- Franchini, G., C. Gurgo, H. G. Guo, R. C. Gallo, E. Collalti, K. A. Fargnoli, L. F. Hall, F. Wong-Staal and M. S. Reitz, Jr. 1987. Sequence of simian immunodeficiency virus and its relationship to the human immunodeficiency viruses. *Nature* 328(6130): 539-43.
- Freund, J. and K. McDermott. 1942. Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc Soc Exp Bio Med* 49: 548-553.
- Gapin, L., J. L. Matsuda, C. D. Surh and M. Kronenberg. 2001. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* 2(10): 971-8.
- Gausling, R., C. Trollmo and D. A. Hafler. 2001. Decreases in interleukin-4 secretion by invariant CD4(-)CD8(-)Valpha 24J alpha Q T cells in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Immunol* 98(1): 11-7.
- Gerlini, G., H. P. Hefti, M. Kleinhan, B. J. Nickoloff, G. Burg and F. O. Nestle. 2001. Cd1d is expressed on dermal dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells. *J Invest Dermatol* 117(3): 576-82.
- Giaccone, G., C. J. Punt, Y. Ando, R. Ruijter, N. Nishi, M. Peters, B. M. Von Blumberg, R. J. Scheper, H. J. Van Der Vliet, A. J. Van Den Eertwegh, M. Roelvink, J. Beijnen, H. Zwierzina and H. M. Pinedo. 2002. A Phase I Study of the Natural Killer T-Cell Ligand alpha-Galactosylceramide (KRN7000) in Patients with Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 8(12): 3702-9.
- Godfrey, D. I., K. J. Hammond, L. D. Poulton, M. J. Smyth and A. G. Baxter. 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 21(11): 573-83.
- Godfrey, D. I., S. J. Kinder, P. Silvera and A. G. Baxter. 1997. Flow cytometric study of T cell development in NOD mice reveals a deficiency in alphabetaTCR+CDR-CD8- thymocytes. *J Autoimmun* 10(3): 279-85.
- Gombert, J. M., A. Herbelin, E. Tancrede-Bohin, M. Dy, C. Carnaud and J. F. Bach. 1996. Early quantitative and functional deficiency of NK1+ like thymocytes in the NOD mouse. *Eur J Immunol* 26(12): 2989-98.

- Gonzalez-Aseguinolaza, G., C. de Oliveira, M. Tomaska, S. Hong, O. Bruna-Romero, T. Nakayama, M. Taniguchi, A. Bendelac, L. Van Kaer, Y. Koezuka and M. Tsuji. 2000. alpha - galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(15): 8461-6.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., L. Van Kaer, C. C. Bergmann, J. M. Wilson, J. Schmieg, M. Kronenberg, T. Nakayama, M. Taniguchi, Y. Koezuka and M. Tsuji. 2002. Natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. *J Exp Med* 195(5): 617-24.
- Gramzinski, R. A., D. L. Doolan, M. Sedegah, H. L. Davis, A. M. Krieg and S. L. Hoffman. 2001. Interleukin-12- and gamma interferon-dependent protection against malaria conferred by CpG oligodeoxynucleotide in mice. *Infect Immun* 69(3): 1643-9.
- Groh, V., R. Rhinehart, J. Randolph-Habecker, M. S. Topp, S. R. Riddell and T. Spies. 2001. Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2(3): 255-60.
- Grouard, G., M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau and Y. J. Liu. 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185(6): 1101-11.
- Haas, D. W., J. Lavelle, J. P. Nadler, S. B. Greenberg, P. Frame, N. Mustafa, M. St Clair, R. McKinnis, L. Dix, M. Elkins and J. Rooney. 2000. A randomized trial of interferon alpha therapy for HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16(3): 183-90.
- Hadler, S. C., D. P. Francis, J. E. Maynard, S. E. Thompson, F. N. Judson, D. F. Echenberg, D. G. Ostrow, P. M. O'Malley, K. A. Penley, N. L. Altman and et al. 1986. Long-term immunogenicity and efficacy of hepatitis B vaccine in homosexual men. *N Engl J Med* 315(4): 209-14.
- Hafner, M., R. Zawatzky, C. Hirtreiter, W. A. Buurman, B. Echtenacher, T. Hehlhans and D. N. Mannel. 2001. Antimetastatic effect of CpG DNA mediated by type I IFN. *Cancer Res* 61(14): 5523-8.
- Hamilton, J. A. 2003. Nondisposable materials, chronic inflammation, and adjuvant action. *J Leukoc Biol* 73(6): 702-12.
- Hammond, K. J., L. D. Poulton, L. J. Palmisano, P. A. Silveira, D. I. Godfrey and A. G. Baxter. 1998. alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 187(7): 1047-56.
- Hartmann, G., J. Battiany, H. Poeck, M. Wagner, M. Kerkmann, N. Lubenow, S. Rothenfusser and S. Endres. 2003. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 33(6): 1633-41.
- Hartmann, G., R. D. Weeratna, Z. K. Ballas, P. Payette, S. Blackwell, I. Suparto, W. L. Rasmussen, M. Waldschmidt, D. Sajuthi, R. H. Purcell, H. L. Davis and A. M. Krieg. 2000. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 164(3): 1617-24.
- Hartmann, G., G. Weiner and A. M. Krieg. 1999. CpG DNA: a potent signal for growth, activation and maturation of human dendritic cells. *PNAS* 96: 9305-9310.
- Hashimoto, C., K. L. Hudson and K. V. Anderson. 1988. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52(2): 269-79.
- Hashimoto, W., K. Takeda, R. Anzai, K. Ogasawara, H. Sakihara, K. Sugiura, S. Seki and K. Kumagai. 1995. Cytotoxic NK1.1 Ag+ alpha beta T cells with intermediate TCR induced in the liver of mice by IL-12. *J Immunol* 154(9): 4333-40.

- Hatzakis, A., P. Gargalianos, V. Kiosses, M. Lazanas, V. Sypsa, C. Anastassopoulou, V. Vigklis, H. Sambatakou, C. Botsi, D. Paraskevis and C. Stalgis. 2001. Low-dose IFN-alpha monotherapy in treatment-naive individuals with HIV-1 infection: evidence of potent suppression of viral replication. *J Interferon Cytokine Res* 21(10): 861-9.
- Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill and A. Aderem. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410(6832): 1099-103.
- Heckelsmiller, K., S. Beck, K. Rall, B. Sipos, A. Schlamp, E. Tuma, S. Rothenfusser, S. Endres and G. Hartmann. 2002a. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 32(11): 3235-45.
- Heckelsmiller, K., K. Rall, S. Beck, A. Schlamp, J. Seiderer, B. Jahrsdorfer, A. Krug, S. Rothenfusser, S. Endres and G. Hartmann. 2002b. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol* 169(7): 3892-9.
- Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda and S. Akira. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3(2): 196-200.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408(6813): 740-5.
- Hirsch, V., N. Riedel, H. Kornfeld, P. J. Kanki, M. Essex and J. I. Mullins. 1986. Cross-reactivity to human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus and molecular cloning of simian T-cell lymphotropic virus type III from African green monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(24): 9754-8.
- Hirsch, V., N. Riedel and J. I. Mullins. 1987. The genome organization of STLV-3 is similar to that of the AIDS virus except for a truncated transmembrane protein. *Cell* 49(3): 307-19.
- Ho, E. L., L. N. Carayannopoulos, J. Poursine-Laurent, J. Kinder, B. Plougastel, H. R. Smith and W. M. Yokoyama. 2002. Costimulation of multiple NK cell activation receptors by NKG2D. *J Immunol* 169(7): 3667-75.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann. 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(9): 4531-7.
- Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda and S. Akira. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162(7): 3749-52.
- Hunt, R. D., B. J. Blake, L. V. Chalifoux, P. K. Sehgal, N. W. King and N. L. Letvin. 1983. Transmission of naturally occurring lymphoma in macaque monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(16): 5085-9.
- Ikarashi, Y., R. Mikami, A. Bendelac, M. Terme, N. Chaput, M. Terada, T. Tursz, E. Angevin, F. A. Lemonnier, H. Wakasugi and L. Zitvogel. 2001. Dendritic cell maturation overrules H-2D-mediated natural killer T (NKT) cell inhibition: critical role for B7 in CD1d-dependent NKT cell interferon gamma production. *J Exp Med* 194(8): 1179-86.
- Ikehara, Y., Y. Yasunami, S. Kodama, T. Maki, M. Nakano, T. Nakayama, M. Taniguchi and S. Ikeda. 2000. CD4(+) Valpha14 natural killer T cells are essential for acceptance of rat islet xenografts in mice. *J Clin Invest* 105(12): 1761-7.

- Illes, Z., T. Kondo, J. Newcombe, N. Oka, T. Tabira and T. Yamamura. 2000. Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol* 164(8): 4375-81.
- Imai, K., M. Kanno, H. Kimoto, K. Shigemoto, S. Yamamoto and M. Taniguchi. 1986. Sequence and expression of transcripts of the T-cell antigen receptor alpha-chain gene in a functional, antigen-specific suppressor-T-cell hybridoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(22): 8708-12.
- Ishihara, S., M. Nieda, J. Kitayama, T. Osada, T. Yabe, Y. Ishikawa, H. Nagawa, T. Muto and T. Juji. 1999. CD8(+)NKR-P1A (+)T cells preferentially accumulate in human liver. *Eur J Immunol* 29(8): 2406-13.
- Janeway, C. 2001. Immunobiology - The Immune System in Health and Disease.
- Jinushi, M., T. Takehara, T. Kanto, T. Tatsumi, V. Groh, T. Spies, T. Miyagi, T. Suzuki, Y. Sasaki and N. Hayashi. 2003. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 170(3): 1249-56.
- Johnson, P. R. and V. M. Hirsch. 1992. SIV infection of macaques as a model for AIDS pathogenesis. *Int Rev Immunol* 8(1): 55-63.
- Jones, T. R., N. Obaldia, 3rd, R. A. Gramzinski, Y. Charoenvit, N. Kolodny, S. Kitov, H. L. Davis, A. M. Krieg and S. L. Hoffman. 1999. Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys. *Vaccine* 17(23-24): 3065-71.
- Kambayashi, T., E. Assarsson, J. Michaelsson, P. Berglund, A. D. Diehl, B. J. Chambers and H. G. Ljunggren. 2000. Emergence of CD8+ T cells expressing NK cell receptors in influenza A virus-infected mice. *J Immunol* 165(9): 4964-9.
- Kaneko, Y., M. Harada, T. Kawano, M. Yamashita, Y. Shibata, F. Gejyo, T. Nakayama and M. Taniguchi. 2000. Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J Exp Med* 191(1): 105-14.
- Kanki, P. J., M. F. McLane, N. W. King, Jr., N. L. Letvin, R. D. Hunt, P. Sehgal, M. D. Daniel, R. C. Desrosiers and M. Essex. 1985. Serologic identification and characterization of a macaque T-lymphotropic retrovirus closely related to HTLV-III. *Science* 228(4704): 1199-201.
- Kannagi, M., J. M. Yetz and N. L. Letvin. 1985. In vitro growth characteristics of simian T-lymphotropic virus type III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(20): 7053-7.
- Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki and M. Taniguchi. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278(5343): 1626-9.
- Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, H. Sato, E. Kondo, M. Harada, H. Koseki, T. Nakayama, Y. Tanaka and M. Taniguchi. 1998. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(10): 5690-3.
- Kawano, T., T. Nakayama, N. Kamada, Y. Kaneko, M. Harada, N. Ogura, Y. Akutsu, S. Motohashi, T. Iizasa, H. Endo, T. Fujisawa, H. Shinkai and M. Taniguchi. 1999. Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells. *Cancer Res* 59(20): 5102-5.
- Kerkmann, M., S. Rothenfusser, V. Hornung, A. Towarowski, M. Wagner, A. Sarris, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann. 2003. Activation with CpG-A and CpG-B Oligonucleotides Reveals Two Distinct Regulatory Pathways of Type I IFN Synthesis in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Immunol* 170(9): 4465-74.

- Kim, C. H., B. Johnston and E. C. Butcher. 2002. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 100(1): 11-6.
- Kitamura, H., K. Iwakabe, T. Yahata, S. Nishimura, A. Ohta, Y. Ohmi, M. Sato, K. Takeda, K. Okumura, L. Van Kaer, T. Kawano, M. Taniguchi and T. Nishimura. 1999. The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med* 189(7): 1121-8.
- Kline, J. N., T. J. Waldschmidt, T. R. Businga, J. E. Lemish, J. V. Weinstock, P. S. Thorne and A. M. Krieg. 1998. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 160(6): 2555-9.
- Kobayashi, M. K., Uchida T, Fukushima H, Koezuka Y. 1995. KRN 7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol Res* 7(10-11): 529-34.
- Kojo, S., Y. Adachi, H. Keino, M. Taniguchi and T. Sumida. 2001. Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18+, BV11+ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 44(5): 1127-38.
- Krieg, A. M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20: 709-60.
- Krieg, A. M., L. Love-Homan, A. K. Yi and J. T. Harty. 1998. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* 161(5): 2428-34.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky and D. M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-9.
- Krug, A., S. Rothenfusser, V. Hornung, B. Jahrsdorfer, S. Blackwell, Z. K. Ballas, S. Endres, A. M. Krieg and G. Hartmann. 2001a. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31(7): 2154-63.
- Krug, A., S. Rothenfusser, S. Selinger, C. Bock, M. Kerkmann, J. Battiany, A. Sarris, T. Giese, D. Speiser, S. Endres and G. Hartmann. 2003a. CpG-A oligonucleotides induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells. *J Immunol* 170(7): 3468-77.
- Krug, A., A. Towarowski, S. Britsch, S. Rothenfusser, V. Hornung, R. Bals, T. Giese, H. Engelmann, S. Endres, A. M. Krieg and G. Hartmann. 2001b. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 31(10): 3026-37.
- Krug, A., R. Veeraswamy, A. Pekosz, O. Kanagawa, E. R. Unanue, M. Colonna and M. Cella. 2003b. Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *J Exp Med* 197(7): 899-906.
- Kukreja, A., G. Costi, J. Marker, C. H. Zhang, S. Sinha, Z. Sun and N. Maclaren. 2002. NKT cell defects in NOD mice suggest therapeutic opportunities. *J Autoimmun* 19(3): 117-28.
- Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson and R. W. Finberg. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1(5): 398-401.
- Lantz, O. and A. Bendelac. 1994. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4- T cells in mice and humans. *J Exp Med* 180(3): 1097-106.

- Lapenta, C., S. M. Santini, E. Proietti, P. Rizza, M. Logozzi, M. Spada, S. Parlato, S. Fais, P. M. Pitha and F. Belardelli. 1999. Type I interferon is a powerful inhibitor of in vivo HIV-1 infection and preserves human CD4(+) T cells from virus-induced depletion in SCID mice transplanted with human cells. *Virology* 263(1): 78-88.
- Lehuen, A., O. Lantz, L. Beaudoin, V. Laloux, C. Carnaud, A. Bendelac, J. F. Bach and R. C. Monteiro. 1998. Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med* 188(10): 1831-9.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86(6): 973-83.
- Letvin, N. L., W. R. Aldrich, N. W. King, B. J. Blake, M. D. Daniel and R. D. Hunt. 1983a. Experimental transmission of macaque AIDS by means of inoculation of macaque lymphoma tissue. *Lancet* 2(8350): 599-602.
- Letvin, N. L., D. H. Barouch and D. C. Montefiori. 2002. Prospects for vaccine protection against HIV-1 infection and AIDS. *Annu Rev Immunol* 20: 73-99.
- Letvin, N. L., K. A. Eaton, W. R. Aldrich, P. K. Sehgal, B. J. Blake, S. F. Schlossman, N. W. King and R. D. Hunt. 1983b. Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(9): 2718-22.
- Liu, Y. J. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106(3): 259-62.
- Loetscher, M., P. Loetscher, N. Brass, E. Meese and B. Moser. 1998. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* 28(11): 3696-705.
- Loza, M. J., L. S. Metelitsa and B. Perussia. 2002. NKT and T cells: coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production. *Eur J Immunol* 32(12): 3453-62.
- Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov and A. Iwasaki. 2003. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 198(3): 513-20.
- MacDonald, H. R. 2002. Development and selection of NKT cells. *Curr Opin Immunol* 14(2): 250-4.
- Mannoor, M. K., A. Weerasinghe, R. C. Halder, S. Reza, M. Morshed, A. Ariyasinghe, H. Watanabe, H. Sekikawa and T. Abo. 2001. Resistance to malarial infection is achieved by the cooperation of NK1.1(+) and NK1.1(-) subsets of intermediate TCR cells which are constituents of innate immunity. *Cell Immunol* 211(2): 96-104.
- Maurer, T., A. Heit, H. Hochrein, F. Ampenberger, M. O'Keeffe, S. Bauer, G. B. Lipford, R. M. Vabulas and H. Wagner. 2002. CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur J Immunol* 32(8): 2356-64.
- Maxwell, J. R., A. Weinberg, R. A. Prell and A. T. Vella. 2000. Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion. *J Immunol* 164(1): 107-12.
- Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1(2): 135-45.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388(6640): 394-7.
- Miconnet, I., S. Koenig, D. Speiser, A. Krieg, P. Guillaume, J. C. Cerottini and P. Romero. 2002. CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J Immunol* 168(3): 1212-8.

- Mieza, M. A., T. Itoh, J. Q. Cui, Y. Makino, T. Kawano, K. Tsuchida, T. Koike, T. Shirai, H. Yagita, A. Matsuzawa, H. Koseki and M. Taniguchi. 1996. Selective reduction of V alpha 14+ NK T cells associated with disease development in autoimmune-prone mice. *J Immunol* 156(10): 4035-40.
- Mildvan, D., Y. Bassiakos, M. L. Zucker, N. Hyslop, Jr., S. E. Krown, H. S. Sacks, J. Zachary, J. Paredes, W. J. Fessel, F. Rhame, F. Kramer, M. A. Fischl, B. Poiesz, K. Wood, R. M. Ruprecht, J. Kim, S. E. Grossberg, P. Kasdan, P. Berge, A. Marshak and C. Pettinelli. 1996. Synergy, activity and tolerability of zidovudine and interferon-alpha in patients with symptomatic HIV-1 infection: AIDS Clinical Trial Group 068. *Antivir Ther* 1(2): 77-88.
- Moldoveanu, Z., L. Love-Homan, W. Q. Huang and A. M. Krieg. 1998. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine* 16(11-12): 1216-24.
- Nakagawa, R., K. Motoki, H. Ueno, R. Iijima, H. Nakamura, E. Kobayashi, A. Shimosaka and Y. Koezuka. 1998. Treatment of hepatic metastasis of the colon26 adenocarcinoma with an alpha-galactosylceramide, KRN7000. *Cancer Res* 58(6): 1202-7.
- Nguyen, K. B., W. T. Watford, R. Salomon, S. R. Hofmann, G. C. Pien, A. Morinobu, M. Gadina, J. J. O'Shea and C. A. Biron. 2002. Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* 297(5589): 2063-6.
- Nicol, A., M. Nieda, Y. Koezuka, S. Porcelli, K. Suzuki, K. Tadokoro, S. Durrant and T. Juji. 2000. Human invariant valpha24+ natural killer T cells activated by alpha-galactosylceramide (KRN7000) have cytotoxic anti-tumour activity through mechanisms distinct from T cells and natural killer cells. *Immunology* 99(2): 229-34.
- Nishimura, T., H. Kitamura, K. Iwakabe, T. Yahata, A. Ohta, M. Sato, K. Takeda, K. Okumura, L. Van Kaer, T. Kawano, M. Taniguchi, M. Nakui, M. Sekimoto and T. Koda. 2000. The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 12(7): 987-94.
- Norris, S., D. G. Doherty, C. Collins, G. McEntee, O. Traynor, J. E. Hegarty and C. O'Farrelly. 1999. Natural T cells in the human liver: cytotoxic lymphocytes with dual T cell and natural killer cell phenotype and function are phenotypically heterogenous and include Valpha24-JalphaQ and gammadelta T cell receptor bearing cells. *Hum Immunol* 60(1): 20-31.
- O'Doherty, U., M. Peng, S. Gezelter, W. J. Swiggard, M. Betjes, N. Bhardwaj and R. M. Steinman. 1994. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82(3): 487-93.
- Ohashi, K., V. Burkart, S. Flohe and H. Kolb. 2000. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164(2): 558-61.
- Ohteki, T. 2002. Critical role for IL-15 in innate immunity. *Curr Mol Med* 2(4): 371-80.
- Ohteki, T. and H. R. MacDonald. 1994. Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice. *J Exp Med* 180(2): 699-704.
- Olweus, J., A. BitMansour, R. Warnke, P. A. Thompson, J. Carballido, L. J. Picker and F. Lund-Johansen. 1997. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(23): 12551-6.
- Osman, Y., T. Kawamura, T. Naito, K. Takeda, L. Van Kaer, K. Okumura and T. Abo. 2000. Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol* 30(7): 1919-28.

- Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder and A. Aderem. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13766-71.
- Parronchi, P., F. Brugnolo, F. Annunziato, C. Manuelli, S. Sampognaro, C. Mavilia, S. Romagnani and E. Maggi. 1999. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4<sup>+</sup> T cells into Th1 effectors. *J Immunol* 163(11): 5946-53.
- Patterson, S., A. Rae, N. Hockey, J. Gilmour and F. Gotch. 2001. Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J Virol* 75(14): 6710-3.
- Pende, D., C. Cantoni, P. Rivera, M. Vitale, R. Castriconi, S. Marcenaro, M. Nanni, R. Biassoni, C. Bottino, A. Moretta and L. Moretta. 2001. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol* 31(4): 1076-86.
- Pied, S., J. Roland, A. Louise, D. Voegtle, V. Soulard, D. Mazier and P. A. Cazenave. 2000. Liver CD4-CD8- NK1.1<sup>+</sup> TCR alpha beta intermediate cells increase during experimental malaria infection and are able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage in vitro. *J Immunol* 164(3): 1463-9.
- Poeck, H., M. Wagner, J. Battiany, S. Rothenfusser, D. Wellisch, V. Hornung, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann. 2004. Plasmacytoid dendritic cells, antigen and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T cell help. *Blood (in press)*.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. V. Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282(5396): 2085-8.
- Prussin, C. and B. Foster. 1997. TCR V alpha 24 and V beta 11 coexpression defines a human NK1 T cell analog containing a unique Th0 subpopulation. *J Immunol* 159(12): 5862-70.
- Reed, L. J. and H. A. Muench. 1938. Simple method of determining fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 494-497.
- Rothenfusser, S., V. Hornung, A. Krug, A. Towarowski, A. M. Krieg, S. Endres and G. Hartmann. 2001. Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta. *Eur J Immunol* 31(12): 3525-34.
- Rothenfusser, S., E. Tuma, S. Endres and G. Hartmann. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG(1). *Hum Immunol* 63(12): 1111-9.
- Rothenfusser, S., E. Tuma, M. Wagner, S. Endres and G. Hartmann. 2003. Recent advances in immunostimulatory CpG oligonucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 5(2): 98-106.
- Salio, M., M. Cella, W. Vermi, F. Facchetti, M. J. Palmowski, C. L. Smith, D. Shepherd, M. Colonna and V. Cerundolo. 2003. Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur J Immunol* 33(4): 1052-62.
- Sato, H., T. Nakayama, Y. Tanaka, M. Yamashita, Y. Shibata, E. Kondo, Y. Saito and M. Taniguchi. 1999. Induction of differentiation of pre-NKT cells to mature Valpha14 NKT cells by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13): 7439-44.
- Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe and C. J. Kirschning. 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274(25): 17406-9.



- Seino, K. I., K. Fukao, K. Muramoto, K. Yanagisawa, Y. Takada, S. Kakuta, Y. Iwakura, L. Van Kaer, K. Takeda, T. Nakayama, M. Taniguchi, H. Bashuda, H. Yagita and K. Okumura. 2001. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5): 2577-81.
- Shimamura, M., T. Ohteki, U. Beutner and H. R. MacDonald. 1997. Lack of directed V alpha 14-J alpha 281 rearrangements in NK1+ T cells. *Eur J Immunol* 27(6): 1576-9.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko and Y. J. Liu. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284: 1835-7.
- Smyth, M. J., N. Y. Crowe, Y. Hayakawa, K. Takeda, H. Yagita and D. I. Godfrey. 2002. NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol* 14(2): 165-71.
- Sonoda, K. H., D. E. Faunce, M. Taniguchi, M. Exley, S. Balk and J. Stein-Streilein. 2001. NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J Immunol* 166(1): 42-50.
- Sonoda, K. H., M. Taniguchi and J. Stein-Streilein. 2002. Long-term survival of corneal allografts is dependent on intact CD1d-reactive NKT cells. *J Immunol* 168(4): 2028-34.
- Soumelis, V., I. Scott, F. Gheyas, D. Bouhour, G. Cozon, L. Cotte, L. Huang, J. A. Levy and Y. J. Liu. 2001. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 98(4): 906-12.
- Soumelis, V., I. Scott, Y. J. Liu and J. Levy. 2002. Natural type 1 interferon producing cells in HIV infection. *Hum Immunol* 63(12): 1206-12.
- Spada, F. M., Y. Koezuka and S. A. Porcelli. 1998. CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med* 188(8): 1529-34.
- Sparwasser, T., R. M. Vabulas, B. Villmow, G. B. Lipford and H. Wagner. 2000. Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur J Immunol* 30(12): 3591-7.
- Speiser, D. E., D. Valmori, D. Rimoldi, M. J. Pittet, D. Lienard, V. Cerundolo, H. R. MacDonald, J. C. Cerottini and P. Romero. 1999. CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients. *Eur J Immunol* 29(6): 1990-9.
- Sprent, J., X. Zhang, S. Sun and D. Tough. 2000. T-cell proliferation in vivo and the role of cytokines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355(1395): 317-22.
- Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-96.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137(5): 1142-62.
- Sumida, T., A. Sakamoto, H. Murata, Y. Makino, H. Takahashi, S. Yoshida, K. Nishioka, I. Iwamoto and M. Taniguchi. 1995. Selective reduction of T cells bearing invariant V alpha 24J alpha Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J Exp Med* 182(4): 1163-8.
- Takeda, K. and S. Akira. 2001. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells* 6(9): 733-42.
- Takeda, K. and G. Dennert. 1993. The development of autoimmunity in C57BL/6 lpr mice correlates with the disappearance of natural killer type 1-positive cells: evidence for their suppressive action on bone marrow stem cell proliferation, B cell immunoglobulin secretion, and autoimmune symptoms. *J Exp Med* 177(1): 155-64.

- Takeda, K., Y. Hayakawa, L. Van Kaer, H. Matsuda, H. Yagita and K. Okumura. 2000. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10): 5498-503.
- Takeda, K., S. Seki, K. Ogasawara, R. Anzai, W. Hashimoto, K. Sugiura, M. Takahashi, M. Satoh and K. Kumagai. 1996. Liver NK1.1+ CD4+ alpha beta T cells activated by IL-12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis. *J Immunol* 156(9): 3366-73.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11(4): 443-51.
- Takeuchi, O., A. Kaufmann, K. Grote, T. Kawai, K. Hoshino, M. Morr, P. F. Muhlradt and S. Akira. 2000. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164(2): 554-7.
- Taniguchi, M., M. Harada, S. Kojo, T. Nakayama and H. Wakao. 2003. The regulatory role of Valpha14NKT cells in innate and acquired. *Annu Rev Immunol* 21: 483-513.
- Terabe, M., S. Matsui, N. Noben-Trauth, H. Chen, C. Watson, D. D. Donaldson, D. P. Carbone, W. E. Paul and J. A. Berzofsky. 2000. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 1(6): 515-20.
- Tokunaga, T., H. Yamamoto, S. Shimada, H. Abe, T. Fukuda, Y. Fujisawa, Y. Furutani, O. Yano, T. Kataoka and T. Sudo. 1984. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 72: 955-62.
- Tomura, M., W. G. Yu, H. J. Ahn, M. Yamashita, Y. F. Yang, S. Ono, T. Hamaoka, T. Kawano, M. Taniguchi, Y. Koezuka and H. Fujiwara. 1999. A novel function of Valpha14+CD4+NKT cells: stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system. *J Immunol* 163(1): 93-101.
- Tough, D. F., P. Borrow and J. Sprent. 1996. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* 272(5270): 1947-50.
- Underhill, D. M., A. Ozinsky, K. D. Smith and A. Aderem. 1999. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25): 14459-63.
- van der Vliet, H. J., N. Nishi, Y. Koezuka, B. M. von Blomberg, A. J. van den Eertwegh, S. A. Porcelli, H. M. Pinedo, R. J. Scheper and G. Giaccone. 2001. Potent expansion of human natural killer T cells using alpha-galactosylceramide (KRN7000)-loaded monocyte-derived dendritic cells, cultured in the presence of IL-7 and IL-15. *J Immunol Methods* 247(1-2): 61-72.
- Verthelyi, D., R. T. Kenney, R. A. Seder, A. A. Gam, B. Friedag and D. M. Klinman. 2002. CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates. *J Immunol* 168(4): 1659-63.
- Vivier, E., E. Tomasello and P. Paul. 2002. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr Opin Immunol* 14(3): 306-11.
- Walker, P. S., T. Scharton-Kersten, A. M. Krieg, L. Love-Homan, E. D. Rowton, M. C. Udey and J. C. Vogel. 1999. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12): 6970-5.
- Watanabe, K., T. Matsubara and S. Hakomori. 1976. alpha-L-Fucopyranosylceramide, a novel glycolipid accumulated in some of the human colon tumors. *J Biol Chem* 251(8): 2385-7.
- Weinberg, A. D., A. T. Vella and M. Croft. 1998. OX-40: life beyond the effector T cell stage. *Semin Immunol* 10(6): 471-80.

- Weiner, G. J., H. M. Liu, J. E. Wooldridge, C. E. Dahle and A. M. Krieg. 1997. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10833-7.
- Whetter, L. E., I. C. Ojukwu, F. J. Novembre and S. Dewhurst. 1999. Pathogenesis of simian immunodeficiency virus infection. *J Gen Virol* 80(7): 1557-68.
- Wild, J., M. J. Grusby, R. Schirmbeck and J. Reimann. 1999. Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent. *J Immunol* 163(4): 1880-7.
- Wilson, M. T., A. K. Singh and L. Van Kaer. 2002. Immunotherapy with ligands of natural killer T cells. *Trends Mol Med* 8(5): 225-31.
- Wilson, S. B., S. C. Kent, H. F. Horton, A. A. Hill, P. L. Bollyky, D. A. Hafler, J. L. Strominger and M. C. Byrne. 2000. Multiple differences in gene expression in regulatory Valpha 24Jalpha Q T cells from identical twins discordant for type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13): 7411-6.
- Wilson, S. B., S. C. Kent, K. T. Patton, T. Orban, R. A. Jackson, M. Exley, S. Porcelli, D. A. Schatz, M. A. Atkinson, S. P. Balk, J. L. Strominger and D. A. Hafler. 1998. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391(6663): 177-81.
- Wooldridge, J. E., Z. Ballas, A. M. Krieg and G. J. Weiner. 1997. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood* 89(8): 2994-8.
- Wu, J., H. Cherwinski, T. Spies, J. H. Phillips and L. L. Lanier. 2000. DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *J Exp Med* 192(7): 1059-68.
- Yamaguchi, Y., K. Motoki, H. Ueno, K. Maeda, E. Kobayashi, H. Inoue, H. Fukushima and Y. Kozuka. 1996. Enhancing effects of (2S,3S,4R)-1-O-(alpha-D-galactopyranosyl)-2-(N-hexacosanoylamino) -1,3,4-octadecanetriol (KRN7000) on antigen-presenting function of antigen-presenting cells and antimetastatic activity of KRN7000-pretreated antigen-presenting cells. *Oncol Res* 8(10-11): 399-407.
- Yamamoto, S., T. Yamamoto, S. Shimada, E. Kuramoto, O. Yano, T. Kataoka and T. Tokunaga. 1992. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol* 36: 983-97.
- Yamamoto, T., S. Yamamoto, T. Kataoka, K. Komuro, M. Kohase and T. Tokunaga. 1994. Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Jpn J Cancer Res* 85: 775-9.
- Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough and J. Sprent. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8(5): 591-9.
- Zimmermann, S., O. Egeter, S. Hausmann, G. B. Lipford, M. Rocken, H. Wagner and K. Heeg. 1998. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 160(8): 3627-30.

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ACAID	<i>Anterior-chamber-associated immune deviation</i>
ADCC	<i>Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
Ag	Antigen
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	1.) Antigen-präsentierende Zelle; 2.) Allophycocyanin
B7.1/B7.2	Kostimulatorische Moleküle (CD80 bzw. CD86)
B 16	Murine Melanom-Zelllinie B 16
BDC	<i>Blood dendritic cell</i>
BDCA-1/ -4	<i>Blood dendritic cell antigen-1/ -4</i>
C 26	Murine Kolonkarzinom-Zelllinie C 26
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CFA	<i>Complete Freund`s adjuvant</i>
CM	<i>Conditioned medium</i> = Kulturüberstände von aktivierten Zellen
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin
CpG-DNA	CpG-haltige DNA
CpG-ODN	CpG-haltige Oligodesoxynukleotide
CTL	Zytotoxische CD8 <sup>+</sup> T-Zellen
DC	Dendritische Zelle
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
ds RNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
α-GalCer	α-Galaktosylceramid
GMCSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HBsAg	Hepatitis B-Oberflächenantigen
HBV	Hepatitis B-Virus
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HSP	Hitzeschock-Protein

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	<i>Interferon-inducible protein-10</i>
IPC	Interferon- $\alpha$ -produzierende Zelle
LAM	Lipoarabinomannan
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	Monoklonaler Antikörper
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MALP-2	Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid 2kDa
MDC	Myeloide dendritische Zelle
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC-I/ MHC-II	<i>Major histocompatibility complex I/ II</i>
MIP-1	<i>Macrophage inflammatory protein-1</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen
NOD-Mäuse	<i>Nonobese diabetic</i> -Mäuse
ODN	Oligodesoxynukleotide
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
Poly-G	Poly-Guanosin
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
SARS	<i>Severe acute respiratory syndrome</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TDT	Terminale Desoxynukleotid-Transferase
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

## DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Stefan Endres für die Aufnahme in seine außergewöhnlich ambitionierte und kollegiale Arbeitsgruppe. Ich bewundere seine stets vorhandene Hilfsbereitschaft und sein großes Engagement für jeden einzelnen seiner Doktoranden und bin ihm dafür sehr dankbar.

Ich bedanke mich auch besonders bei PD Dr. Gunther Hartmann für die kontinuierliche Betreuung meiner Arbeit. Seine Begeisterung für die Wissenschaft hat mich sehr stark motiviert. Ich danke Dr. Anne Krug für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und die Einarbeitung in das NKT-Zell-Projekt. Bei Dr. Simon Rothenfußer möchte ich mich ganz besonders für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung bedanken. Mit sehr großem Engagement und Interesse hat er meine Arbeit unterstützt.

Frau Rosemarie Kiefl danke ich für die Einführung in experimentelle Techniken und ihre hilfreiche Unterstützung im Labor. Bei allen anderen Doktoranden der Abteilung, insbesondere bei Miren Kerkmann, Veit Hornung, Moritz Wagner, Julia Battiany und Daniela Wellisch, möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit, ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bedanken. Bei Iris Sultani möchte ich mich sehr herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Ich bedanke mich bei den Kooperationspartnern unserer Arbeitsgruppe, insbesondere bei Dr. Christiane Stahl-Henning (DPZ Göttingen) und Dr. Ralf Ignatius (Institut f. Med. Mikrobiologie und Infektionsimmunologie, Charité, Berlin).

Schließlich möchte ich meinen Eltern, Roswitha und Viktor Sarris, die mir mein Studium und meine Promotion ermöglicht haben, sehr herzlich für Ihre liebevolle Unterstützung danken.

VERÖFFENTLICHUNGEN

*Originalarbeiten*

- Krug, A., S. Rothenfusser, S. Selinger, C. Bock, M. Kerkmann, J. Battiany, **A. Sarris**, T. Giese, D. Speiser, S. Endres, G. Hartmann.  
CpG-A oligonucleotides induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8<sup>+</sup> T cells.  
*Journal of Immunology* 2003;170(7):3468-77.
- Kerkmann, M.°, S. Rothenfusser °, V. Hornung, A. Towarowski, M. Wagner, **A. Sarris**, T. Giese, S. Endres, G. Hartmann. (°contributed equally)  
Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells.  
*Journal of Immunology* 2003;170:4465-74.
- Rothenfusser, S.°, V. Hornung°, M. Ayyoub, S. Britsch, A. Towarowski, A. Krug, **A. Sarris**, N. Lubenow, D. Speiser, S. Endres, G. Hartmann. (°contributed equally)  
CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8<sup>+</sup> T cell responses in vitro.  
*Blood* 2004;103:2162-2169.
- **Marschner, A.**, S. Rothenfusser, V. Hornung, A. Krug, M. Kerkmann, D. Wellisch, M. Wagner, A. Greinacher, T. Giese, S. Endres, G. Hartmann.  
CpG oligonucleotides enhance antigen-specific NKT cell activation via plasmacytoid dendritic cells.  
(2004 eingereicht)
- Hartmann, G., **A. Marschner**, P. Renner Viveros, C. Stahl-Henning, M. Eisenblätter, J. S. Suh, S. Endres, K. Tenner-Racz, R. M. Steinman, R. Ignatius.  
CpG oligonucleotides enhance humoral immune response without supporting CD4 T cell responses in rhesus macaques in vivo.  
(*Vaccine*, 2004 in revision)

*Posterpräsentation auf Kongressen*

- **Sarris, A.**, M. Kerkmann, S. Endres, G. Hartmann.  
Distinct CpG ODN with high IFN- $\alpha$  induction drive monocytes towards an activated memory phenotype which promotes the development of effector memory CD8<sup>+</sup> T cells. (*Vortrag und Poster*)  
*Experimental Biology* 2002. New Orleans, USA.
- Kerkmann, M., **A. Sarris**, S. Endres, G. Hartmann.  
Regulation of IFN- $\alpha$  production in plasmacytoid dendritic cells by CpG oligonucleotides and CD40 ligand.  
*Experimental Biology* 2002. New Orleans, USA.

- Bock, C., E. v. Stebut, **A. Sarris**, A. Krug, S. Rothenfusser, M. Kerkmann, S. Endres, G. Hartmann.  
Human monocytes primed with GMCSF and IFN- $\gamma$  and stimulated with CpG ODN form multinucleated giant cells which control intracellular replication of *Leishmania major*.  
*Experimental Biology 2002*. New Orleans, USA.
- **Sarris, A.**, S. Rothenfusser, V. Hornung, A. Krug, M. Kerkmann, D. Wellisch, M. Wagner, S. Endres, G. Hartmann.  
CpG-activated plasmacytoid dendritic cells regulate antigen-specific natural killer T cell activation via both interferon- $\alpha$  and antigen-independent cell-to-cell contact.  
*International Immunology 2003*. Denver, USA.
- Hartmann G., C. Stahl-Henning, **A. Sarris**, R. Steinman, R. Ignatius.  
CpG Oligonucleotides in Vaccination Studies in Rhesus Macaques.  
*Deutscher Immunologenkongress 2003*. Berlin.



---

**LEBENS LAUF**

**Name:** Anja Kristina Marschner, geb. Sarris

**Geburtsdatum:** 20. Februar 1975

**Geburtsort:** Usingen/Ts.

**Familienstand:** verheiratet (seit 2004)

**Eltern:** Viktor Sarris, Universitätsprofessor  
Roswitha Sarris, geb. Beinke, Grundschullehrerin

**Geschwister:** Sonja Peetz, geb. Sarris, Ärztin

**Schulbildung:** Christian-Wirth-Gymnasium Usingen 1987-1994  
Abitur 1994

**Hochschulausbildung:** 1995-2000: Studium der Pharmazie an der Johannes  
Gutenberg-Universität Mainz  
1997: 1. Staatsexamen  
1999: 2. Staatsexamen  
1999-2000: Praktisches Jahr  
1. Halbjahr: Löwen-Apotheke, Wiesbaden  
2. Halbjahr: Firma Novartis GmbH, München  
2000: 3. Staatsexamen  
Approbation als Apothekerin

**Promotion:** Seit Januar 2001:  
Doktorarbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie (Leiter:  
Prof. Dr. Stefan Endres), Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum  
der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe  
*"Therapeutische Oligonukleotide"* von PD Dr. Gunther Hartmann.