

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Unterschiede in IFN- α -Produktion und Signaltransduktion der
plasmazytoiden dendritischen Zelle nach Stimulation mit
CpG-A und CpG-B**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Daniela Sauter, geb. Wellisch

aus Kempten

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. S. Endres
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. R. Haas
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. A. Imhof Prof. Dr. med. H. Ostermann
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. med. G. Hartmann PD Dr. med. S. Rothenfußer
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	18.10.2007

Für Anna Schiller

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Das humane Immunsystem	1
1.1.1	Angeborene und adaptive Immunität	1
1.1.2	Antigenerkennung im adaptiven Immunsystem: Individuelles Rezeptor-Arrangement	2
1.1.3	Antigenerkennung im angeborenen Immunsystem: <i>Pathogen- associated molecular patterns</i> und <i>pattern recognition receptors</i>	3
1.2	Die Familie der <i>Toll-like</i> -Rezeptoren	4
1.2.1	Die Entdeckung der <i>Toll-like</i> -Rezeptoren: <i>Drosophila-Toll</i>	4
1.2.2	Die humanen <i>Toll-like</i> -Rezeptoren und ihre Liganden	4
1.2.3	Die Expression der <i>Toll-like</i> -Rezeptoren durch Immunzellen	5
1.2.4	Signaltransduktion durch <i>Toll-like</i> -Rezeptoren	6
1.3	Signaltransduktion durch <i>Mitogen-activated protein</i> -Kinasen	10
1.4	Signaltransduktion über <i>Nuclear factor-κB</i>	11
1.5	Typ-I-Interferone als Effektormechanismen der angeborenen Immunität	13
1.5.1	Die Familie der Interferone	13
1.5.2	Typ-I-Interferone in der antiviralen Immunantwort	13
1.5.3	Regulation der IFN-α/β-Transkription: <i>Interferon regulatory factors</i>	14
1.5.4	Molekulare Mechanismen der Interferon-α/β-Induktion	15
1.5.5	Signaltransduktion über den Interferon-α/β-Rezeptor	17
1.6	Immunstimulatorische DNA	17
1.6.1	CpG-DNA als <i>pathogen-associated molecular pattern</i>	17
1.6.2	Einteilung der CpG-Oligonukleotide: CpG-A und CpG-B	18
1.6.3	Wirkungen der CpG-Oligonukleotide auf das Immunsystem	20
1.6.4	Molekulare Wirkmechanismen der CpG-Oligonukleotide	21
1.6.5	CpG-Oligonukleotide als Stimulans in der Immuntherapie	22
1.7	Die plasmazytoide dendritische Zelle	24
1.7.1	Die Familie der dendritischen Zellen	24
1.7.2	Subpopulationen dendritischer Zellen: Myeloide dendritische Zelle und plasmazytoide dendritische Zelle	24
1.7.3	Die Herkunft der plasmazytoiden dendritischen Zelle	25
1.7.4	Funktionelle Charakteristika der plasmazytoiden dendritischen Zelle	25
1.8	Fragestellung	27

2.	MATERIAL UND METHODEN	29
2.1	Geräte, Chemikalien und Reagenzien	29
2.1.1	Geräte	29
2.1.2	Chemikalien	29
2.1.3	Materialien für die Zellkultur	30
2.1.4	Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen	30
2.1.5	Reagenziensätze	31
2.1.6	Antikörper	31
2.1.7	CpG-Oligodeoxynukleotide und PCR-Primer	32
2.1.8	Inhibitoren	32
2.1.9	Western Blot (Materialien).....	33
2.2	Zellulär-immunologische Methoden	33
2.2.1	Aufreinigung von Zellpopulationen	33
2.2.2	Zellkultur	34
2.2.3	Durchflusszytometrie	36
2.2.4	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i>	38
2.2.5	<i>Bio-Plex phosphoprotein assay</i>	39
2.3	Molekularbiologische Methoden	39
2.3.1	Quantitative Bestimmung der Expression verschiedener IFN- α -Subtypen ..	39
2.3.2	Western Blot	44
3.	ERGEBNISSE	46
3.1	<i>Teil I: Charakterisierung der unterschiedlichen Wirkungen von CpG-A und CpG-B Desoxyoligonukleotiden auf die humane plasmazytoide dendritische Zelle</i>	46
3.1.1	Die CpG-A- und die CpG-B-induzierte Interferon- α -Produktion in der plasmazytoiden dendritischen Zelle zeigt einen unterschiedlichen zeitlichen Verlauf	46
3.1.2	Während CpG-A und CpG-B ein ähnliches Spektrum an frühen Interferon- α -Subtypen induzieren, führt nur Stimulation mit CpG-A zu einer späten Interferon- α -Produktion mit einem distinkten Muster an Interferon- α -Subtypen	47
3.2	<i>Teil II: Analyse von Unterschieden in den durch CpG-A- und CpG-B-Desoxyoligonukleotiden ausgelösten Signaltransduktionswegen</i>	51
3.2.1	Aktivierung von p38, JNK, I κ B und Stat3 durch CpG-A und CpG-B in der B-Zelle	51

3.2.2	Analyse der Aktivierung von p38, ERK und Stat1 durch CpG-A und CpG-B in der plasmazytoiden dendritischen Zelle	53
3.2.3	Analyse der funktionellen Bedeutung von MAP-Kinasen und NF- κ B auf die CpG-A- und CpG-B-induzierte Aktivierung und Zytokinproduktion in der plasmazytoiden dendritischen Zelle	57
4.	DISKUSSION	71
4.1	Unterschiede der IFN- α -Induktion in der PDC durch CpG-A und CpG-B	73
4.1.1	Unterschiedliche Kinetiken der IFN- α -Produktion in der PDC nach Stimulation mit CpG-A und CpG-B	73
4.1.2	Unterschiedliche Phasen der IFN- α -Produktion in der PDC	74
4.1.3	Qualitativ unterschiedliche Phasen der IFN- α -Produktion in der PDC als Ausdruck eines differenziert regulierten Rückkopplungsmechanismus nach Stimulation mit CpG-ODN	75
4.2	Modellvorstellungen der unterschiedlichen Wirkmechanismen von CpG-A und CpG-B	77
4.2.1	Subzelluläre Lokalisation, Rezeptorbindung und Aktivierung von Signaltransduktionswegen durch CpG-A und CpG-B	77
4.2.2	Erklärungsmodelle für die NF- κ B-induzierte Hemmung der IFN- α -Induktion durch CpG-B in der PDC	82
4.2.3	Erklärungsmodelle für die NF- κ B-induzierte Förderung der IFN- α -Induktion durch CpG-A in der PDC	84
4.2.4	Warum übt NF- κ B je nach Stimulus hemmende oder fördernde Einflüsse auf die IFN- α -Produktion aus?	84
4.2.5	Zusammenfassung einer Modellvorstellung der unterschiedlichen Wirkmechanismen von CpG-A und CpG-B in der PDC.....	85
5.	ZUSAMMENFASSUNG	89
6.	LITERATURVERZEICHNIS	91
	Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	100
	Danksagung	102
	Veröffentlichungen	103
	Lebenslauf	104

1. EINLEITUNG

1.1 Das menschliche Immunsystem

Infektionskrankheiten stellen seit jeher eine große Bedrohung des menschlichen Organismus dar. 1876 konnte Robert Koch *Bacillus anthracis* als Verursacher des Milzbrandes nachweisen und somit Mikroorganismen als verursachendes Agens vieler bis zu diesem Zeitpunkt in ihrer Ätiologie vollkommen unverstandenen Krankheiten identifizieren. Kochs Nachweis lieferte eine wichtige Grundlage für die Entwicklung der Immunologie, also der Wissenschaft, die sich mit den Abwehrmechanismen des Körpers gegen die verschiedenen Mikroorganismen beschäftigt. Als Begründer der Immunologie wird gemeinhin Edward Jenner angesehen. Dieser konnte 1796 – bereits 80 Jahre vor Robert Kochs bahnbrechenden Versuchen - beweisen, dass eine Infektion mit Kuhpocken Schutz gegen die weitaus gefährlicheren Pocken verlieh, und somit wichtige Grundlagen für die Prävention von Infektionserkrankungen durch aktive Immunisierung liefern. Eine der wichtigsten Aufgaben des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ – worunter neben eindringenden Mikroorganismen auch Virus-infizierte und entartete Zellen verstanden werden – ohne die es dem menschlichen Organismus unmöglich wäre, in der ständigen Konfrontation mit den verschiedensten Mikroorganismen seine Integrität zu bewahren. Schwere Infektionen einerseits und Autoimmunerkrankungen andererseits können Folgen fehlgeleiteter Erkennungsmechanismen des Immunsystems sein und veranschaulichen deren Bedeutung als Grundlage der Bewahrung der Unversehrtheit des Organismus.

1.1.1 Angeborene und adaptive Immunität

In der Immunologie hat sich eine modellhafte Unterteilung des Immunsystems in angeborene Immunität und adaptive Immunität etabliert, die zwei verschiedenen Funktionsprinzipien vornehmlich der Antigen-Erkennung Rechnung trägt: Während die angeborene Immunität zur Erkennung von pathogenen Mikroorganismen eine begrenzte Anzahl von genetisch determinierten Rezeptoren einsetzt, die hoch konservierte und vielen Mikroorganismen gemeinsame Strukturen erkennen, zeichnet sich das erworbene Immunsystem durch eine spezifische Antwort auf Pathogene aus; diese wird durch in jeder Zelle infolge somatischer Rekombination neu entstandene Rezeptoren vermittelt und zieht die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnis nach sich.

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie des menschlichen Organismus gegenüber eindringenden pathogenen Mikroorganismen dar. Im Gegensatz zur adaptiven Immunität handelt es sich hier um ein sehr altes Abwehrsystem, das in ähnlicher Form in Vertebraten, Wirbellosen und vermutlich sogar Pflanzen existiert. Erst im Laufe der Evolution entwickelte sich die hoch spezialisierte adaptive Immunität, so dass die gesamte Immunabwehr in Invertebraten, wie z.B. der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, durch das angeborene Immunsystem übernommen wird. Wird der menschliche Körper mit einem pathogenen Mikroorganismus konfrontiert, so stehen eine Reihe von sofort verfügbaren Mechanismen der angeborenen Immunität zur Verfügung, welche die Infektion in vielen Fällen verhindern oder auslöschen können, wie Haut- und Schleimhautbarrieren, Phagozyten und Komplementsystem. Besteht die Infektion fort, werden die *early induced responses* der angeborenen Immunität in Gang gesetzt, die unter Beteiligung von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, Interferon, neutrophilen Granulozyten und Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) das klinische Bild der Entzündung im infizierten Gewebe induzieren. Sollte das Pathogen noch immer nicht eliminiert sein, besteht eine weitere Aufgabe des angeborenen Immunsystems in der Aktivierung der adaptiven Immunität, welche die Infektion in den meisten Fällen stoppen kann, und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (Janeway and Medzhitov 2002).

1.1.2 Antigenerkennung im adaptiven Immunsystem: Individuelles Rezeptor-Arrangement

Die Effektorzellen der adaptiven Immunität sind B- und T-Lymphozyten. Jeder einzelne Lymphozyt ist mit einem einzigartigen Rezeptor ausgestattet, der nicht als Erkennungsmechanismus einer bekannten Pathogenstruktur in der Keimbahn weitergegeben wurde, sondern in jedem Individuum von neuem durch eine Reihe von Mechanismen entsteht, die eine unvorstellbare Vielfalt verschiedener Rezeptoren hervorbringt:

Das ist zunächst der Mechanismus des *gene rearrangement*, bei dem jeder Lymphozyt durch individuelle Zusammensetzung der verschiedenen und in zahlreichen Ausprägungen vorhandenen Segmente, die zusammen für einen B- oder T-Zell-Rezeptor kodieren, einen einzigartigen Rezeptor erhält. Die Variabilität durch Kombination verschiedener Segmente wird noch vergrößert durch das Hinzufügen oder Entfernen einzelner Nukleotide an den Verknüpfungsstellen der Segmente, was als *junctional diversity* bezeichnet wird. Trifft nun ein Lymphozyt auf ein Antigen, das von seinem Rezeptor erkannt wird, läuft ein weiterer entscheidender Mechanismus der

adaptiven Immunität ab: Es kommt zu einer starken Vermehrung dieser Zelle, der klonalen Selektion. Durch somatische Hypermuation – Punktmutationen im Rezeptorbereich – wird während dieser Vermehrung eine optimierte Anpassung an das Antigen gewährleistet. Durch den beschriebenen Prozess steht nun ein hoch spezialisierter Zellklon zur Bekämpfung eines Pathogens mit den Effektormechanismen des adaptiven Immunsystems bereit. Nach abgelaufener Immunantwort persistieren sogenannte Gedächtniszellen, die dem Individuum im Falle eines erneuten Kontaktes mit dem gleichen Pathogen zu einer noch schnelleren und effektiveren Abwehr verhelfen. Die Anzahl verschiedener B- und T-Zell-Rezeptoren, die in einem Individuum im Laufe eines Lebens gebildet werden, wird in einem Bereich von 10^{14} bis 10^{18} angenommen. Durch diese enorme Variabilität vorhandener Rezeptoren existieren mit großer Wahrscheinlichkeit Erkennungsmechanismen für viele Pathogene (Chaplin 2006). Da der komplizierte Mechanismus der adaptiven Immunität bei Erstkontakt mit einem Antigen eine Zeit von zwei bis drei Tagen für eine effiziente Abwehr benötigt, ist das Vorhandensein von schnellen und weniger spezifischen Abwehrmechanismen unerlässlich; diese Rolle übernimmt das angeborene Immunsystem.

1.1.3 Antigenerkennung im angeborenen Immunsystem: *Pathogen-associated molecular patterns* und *pattern recognition receptors*

Die Rezeptoren der angeborenen Immunität, die auch als *pattern recognition receptors* (PRR) bezeichnet werden, unterscheiden sich in mehreren Charakteristika von den Rezeptoren der adaptiven Immunität (Takeda, Kaisho et al. 2003) :

- Sie werden über die Keimbahn vererbt und entstehen nicht in jeder Generation neu durch das Arrangement von Gensegmenten.
- Sie sind nicht klonal verteilt, sondern werden in typischer Zusammensetzung von einer Zellart exprimiert.
- Sie vermitteln unmittelbare und schnelle Effekte.
- Sie erkennen eine große Anzahl verschiedener Pathogene.

Zu den vermittelten Funktionen gehören Phagozytose, Chemotaxis sowie die Induktion von Effektormolekülen im Rahmen der induzierten angeborenen Immunantwort und der Initiation der adaptiven Immunität. Die Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ wird über hoch konservierte und vielen Pathogenen gemeinsame repetitive Strukturen vermittelt, die auf Wirtszellen nicht zu finden sind: den sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Typischerweise erfüllen die PAMPs eine für den Mikroorganismus essenzielle Funktion und können so nur sehr begrenzt durch Selektionsdruck verändert werden (Medzhitov and Janeway 2000). Zur Gruppe der PRR gehören u.a. Mitglieder der Familie der Lektin-Rezeptoren (Banchereau, Briere et

al. 2000), der *scavenger*-Rezeptoren (Peiser, Mukhopadhyay et al. 2002) und der *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) (Barton and Medzhitov 2002).

1.2 Die Familie der *Toll-like*-Rezeptoren

1.2.1 Die Entdeckung der *Toll-like*-Rezeptoren: *Drosophila-Toll*

Die Rezeptoren der angeborenen Immunität sind phylogenetisch alte Erkennungsmechanismen des Immunsystems. Eine wichtige Familie von PRR, die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR), wurde zuerst in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt und untersucht: 1988 wurde der Toll-Rezeptor in *Drosophila* als Transmembranprotein beschrieben, das an der Etablierung der dorso-ventralen Polarität während der embryonalen Entwicklung beteiligt ist (Hashimoto, Hudson et al. 1988). Bereits früh verwies die Ähnlichkeit der Signaltransduktion durch *Drosophila-Toll* mit dem humanen Interleukin (IL)-1-Rezeptor auf eine mögliche Funktion von Toll in Immunprozessen (Belvin and Anderson 1996). Diese Annahme konnte 1996 durch eine Reihe von Experimenten in *knock-out*-Fliegen bestätigt werden: Die mutierten Fliegen, denen verschiedene Komponenten des Toll-Signalweges fehlten, zeigten eine gesteigerte Anfälligkeit für Pilzinfektionen, die im Fehlen des antifungalen Peptids Drosomycin begründet lag (Lemaitre, Nicolas et al. 1996). Ein Jahr nach dem Nachweis der Beteiligung von *Drosophila-Toll* an der Abwehr von Pilzinfektionen wurde ein humanes Homolog von Toll identifiziert (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997), das sich als Mitglied einer großen Familie von PRR erweisen sollte, die im folgenden als *Toll-like*-Rezeptoren bezeichnet wurden. Auf eine Rolle dieses Rezeptors – *Toll-like*-Rezeptor 4 (TLR4) – in Immunprozessen wurde aus seiner Fähigkeit zur Induktion proinflammatorischer Zytokine geschlossen. 1998 konnte eine Beteiligung von TLR4 an der Erkennung von Lipopolysaccharid (LPS), einem Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, durch Untersuchung zweier natürlicherweise Endotoxintoleranter Mauslinien gezeigt werden (Poltorak, He et al. 1998).

1.2.2 Die humanen *Toll-like*-Rezeptoren und ihre Liganden

Mittlerweile sind zehn Mitglieder der humanen TLR-Familie bekannt. Für die meisten TLR wurden natürliche Liganden identifiziert, die als PAMPs der Erkennung mikrobieller Strukturen durch das Immunsystem dienen (s. Tab. 1). Hierbei ist auch eine Kooperation verschiedener TLR zur Erkennung bestimmter Liganden beschrieben, die wohl einer größeren Variabilität erkannter Muster und der Modulation der vermittelten Immunantwort dient (Hajjar, O'Mahony et al. 2001). So kooperiert

TLR2 mit TLR1 und TLR6 bei der Bindung verschiedener Lipoproteine. Ein ähnlicher Mechanismus wird für TLR7, TLR8 und TLR9 angenommen, die in ihrer Struktur große Ähnlichkeiten aufweisen (Hemmi, Kaisho et al. 2002).

TLR	Ligand	Herkunft	Quelle
TLR1	Kooperiert mit TLR2		(Wyllie, Kiss-Toth et al. 2000)
TLR2	Lipoproteine/-peptide Peptidoglykane Lipoteichonsäure Zymosan	Versch. Path. Grampos. Bakt. Grampos. Bakt. Pilze	(Aliprantis, Yang et al. 1999) (Aliprantis, Yang et al. 1999) (Aliprantis, Yang et al. 2000) (Underhill, Ozinsky et al. 1999)
TLR3	Doppelstr. RNA	Viren	(Alexopoulou, Holt et al. 2001)
TLR4	LPS Fusionsproteine Hitzeschockproteine Hyaluronsäure	Gramneg. Bakt. Viren Wirt Wirt	(Poltorak, He et al. 1998) (Kurt-Jones, Popova et al. 2000) (Gallucci and Matzinger 2001) (Termeer, Benedix et al. 2002)
TLR5	Flagellin	Bakterien	(Hayashi, Smith et al. 2001)
TLR6	Kooperiert mit TLR2		(Hajjar, O'Mahony et al. 2001)
TLR7	Imidazoquinoline Einzelsträngige RNA	Synthetisch Viren	(Hemmi, Kaisho et al. 2002) (Heil, Hemmi et al. 2004)
TLR8	Imidazoquinoline Einzelsträngige RNA	Synthetisch Viren	(Jurk, Heil et al. 2002) (Heil, Hemmi et al. 2004)
TLR9	CpG-DNA	Mikrob. DNA	(Hemmi, Takeuchi et al. 2000)
TLR10	Unbekannt		

Tabelle 1 Die humanen TLR und ihre Liganden

1.2.3 Die Expression der *Toll-like*-Rezeptoren durch Immunzellen

Als Rezeptoren des angeborenen Immunsystems werden TLR in genetisch determinierter Weise in bestimmten Kombinationen von verschiedenen Zellarten exprimiert. Ihrer Funktion entsprechend handelt es sich hierbei in erster Linie um Immunzellen; doch auch in einer Vielzahl von anderen Gewebetypen spielen TLR als Vermittler immunologischer Prozesse eine wichtige Rolle, wie z.B. im Lungenepithel, in der Darmmukosa und in Mesothelzellen (Zarembler and Godowski 2002). Monozyten exprimieren mit TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR8 ein breites Spektrum an TLR (Hornung, Rothenfusser et al. 2002). Ebenso sind verschiedene TLR auf NK-Zellen und Mastzellen zu finden. Neben TLR1, TLR6 und TLR10 exprimieren

B-Zellen auch TLR7 und TLR9. TLR7 und TLR9 sind unter den Immunzellen bis jetzt erst auf der B-Zelle und der plasmazytoiden dendritischen Zelle (PDC) beschrieben. Diese Beobachtung korreliert mit der Tatsache, dass nur die beiden Zellarten direkt durch CpG-DNA als TLR9-Liganden aktiviert werden. Die Tatsache, dass nach jetzigem Kenntnisstand TLR7 ausschließlich in Kombination mit TLR9 exprimiert wird, liefert einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Kooperation dieser beiden TLR bei der Erkennung von Nukleinsäuren.

Die verschiedenen TLR unterscheiden sich in ihrer subzellulären Lokalisation: Während TLR1, TLR2 und TLR4 auf der Zelloberfläche lokalisiert sind und nach Aktivierung in Phagosomen aufgenommen werden, werden TLR7, TLR8 und TLR9 nicht auf der Oberfläche exprimiert (Ahmad-Nejad, Hacker et al. 2002). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass TLR9 im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und nach Stimulation in endosomal/lysosomale Kompartimente transloziert (Latz, Schoenemeyer et al. 2004). Die Expression von TLR unterliegt verschiedenen modulierenden Einflüssen wie dem Differenzierungsgrad einer Zelle, der Ausschüttung von Zytokinen oder dem Vorhandensein mikrobieller Stimuli. So führt die Sekretion von Typ-I-Interferonen im Verlauf einer viralen Infektion zu einer verstärkten Expression von TLR auf verschiedenen Immunzellen. Für die PDC ist ein Rückgang der TLR9-Expression im Laufe ihrer Ausreifung – sei sie durch Stimulation mit IL-3 oder CpG-DNA bedingt – beschrieben, während TLR7 nach Ausreifung der PDC mit IL-3 vermindert, nach Stimulation mit CpG-DNA jedoch verstärkt exprimiert wird (Hornung, Rothenfusser et al. 2002).

1.2.4 Signaltransduktion durch *Toll-like*-Rezeptoren

Der Myeloid differentiation factor 88-abhängige Signaltransduktionsweg

Wichtige strukturelle Charakteristika der *Toll-like*-Rezeptoren stellen eine extrazelluläre Domäne bestehend aus Leucin-reichen Motiven (LRR) sowie die intrazelluläre Toll-/IL-1-Rezeptor-Domäne (TIR) dar (Rock, Hardiman et al. 1998). Die große Ähnlichkeit des intrazellulären Rezeptorabschnittes zwischen den TLR und dem IL-1-Rezeptor setzt sich über die Rezeptorstruktur hinaus in der aktivierten Signalkaskade fort. Über mehrere Zwischenschritte, welche die Aktivierung von Adaptorproteinen und Kinasen einschließen, werden schließlich der Transkriptionsfaktor *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) und die *mitogen-activated protein*-(MAP)-Kinasen aktiviert und somit eine grundlegende inflammatorische Reaktion initiiert. 1998 konnte in einer Reihe von Experimenten die Bedeutung des Adaptorproteins *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) für die Signaltransduktion durch TLR gezeigt werden: In MyD88-defizienten

Mäusen blieb eine inflammatorische Antwort auf Stimulation mit IL-1 aus (Kawai, Adachi et al. 1999). Ebenso verhielt es sich unter Stimulation mit Lipoproteinen, Peptidoglykanen, CpG-DNA, Imidazoquinolinen und Flagellin (Hacker, Vabulas et al. 2000; Takeuchi, Takeda et al. 2000). Weitere an der TLR-Signalkaskade beteiligte Signaltransduktionsmoleküle sind die IL-1-assoziierten-Kinasen 1 und 4 (IRAK1 und 4), der TNFR-assoziierte-Faktor 6 (TRAF6), die *transforming growth factor- β* (TGF- β)-*activated* Kinase (TAK1), das *TAK1-binding protein 1* (TAB1) und TAB2 (Takeda, Kaisho et al. 2003).

Das Adaptorprotein MyD88 ist charakterisiert durch eine TIR-Domäne, welche die Assoziation an TLR vermittelt, und eine *death domain*, über die IRAK4 und als Folge IRAK1 rekrutiert werden (Muzio, Ni et al. 1997). Nach Phosphorylierung von IRAK1 durch IRAK4 lagert sich TRAF6 an phosphoryliertes IRAK1 und die beiden Moleküle dissoziieren vom Rezeptor ab, um einen Komplex mit der Kinase TAK1 und den Adaptormolekülen TAB1 und TAB2 an der Plasmamembran zu bilden. Nach Phosphorylierung von TAK1 und TAB2 wird IRAK1 degradiert und der restliche Komplex transloziert ins Zytosol. Die Assoziation mit zwei Ubiquitin-Ligasen führt zur Ubiquitylierung von TRAF6, welche die Aktivierung von TAK1 induziert. TAK1 – ein Mitglied der MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) Familie – phosphoryliert nun den IKK-Komplex und die MAP-Kinasen p38, *extracellular regulated kinase* (ERK) und *c-Jun-N-terminal kinase* (JNK). Aktivierung von NF- κ B durch den IKK-Komplex und *activator protein 1* (AP1) durch die MAP-Kinasen führt zur Expression von deren Zielgenen. (s. Abb. 1)

1.2.4.2 Myeloid differentiation factor 88-unabhängige Signaltransduktion

Auch wenn MyD88-defiziente Mäuse nicht zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen als Antwort auf LPS fähig sind, so führt TLR4-Aktivierung dennoch zur Aktivierung von NF- κ B (Kawai, Adachi et al. 1999), zur Expression einer Reihe von Genen aus der Gruppe der Interferon-induzierbaren Gene (Kawai, Takeuchi et al. 2001) und zur Reifung von dendritischen Zellen (Kaisho, Takeuchi et al. 2001). Diese ersten Hinweise auf die Existenz MyD88-unabhängiger Signalwege konnten durch die Identifizierung weiterer Adaptormoleküle erklärt werden. Die weitere Aufklärung der Signaltransduktionswege der einzelnen TLR liefert einen Ansatzpunkt zur Erklärung der unterschiedlichen Wirkungen, die durch Bindung verschiedener Liganden an ihre TLR bzw. durch Aktivierung verschiedener TLR auf unterschiedlichen Zellarten vermittelt werden. Zu den Adaptormolekülen, die von TLR rekrutiert werden, zählen neben MyD88 das *TIR-domain-containing adaptor protein* (TIRAP; auch *MyD88-adaptor-like protein*, MAL), *TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*

(TRIF, auch *TIR-domain-containing molecule 1*, TICAM1) und das *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM, auch TICAM2).

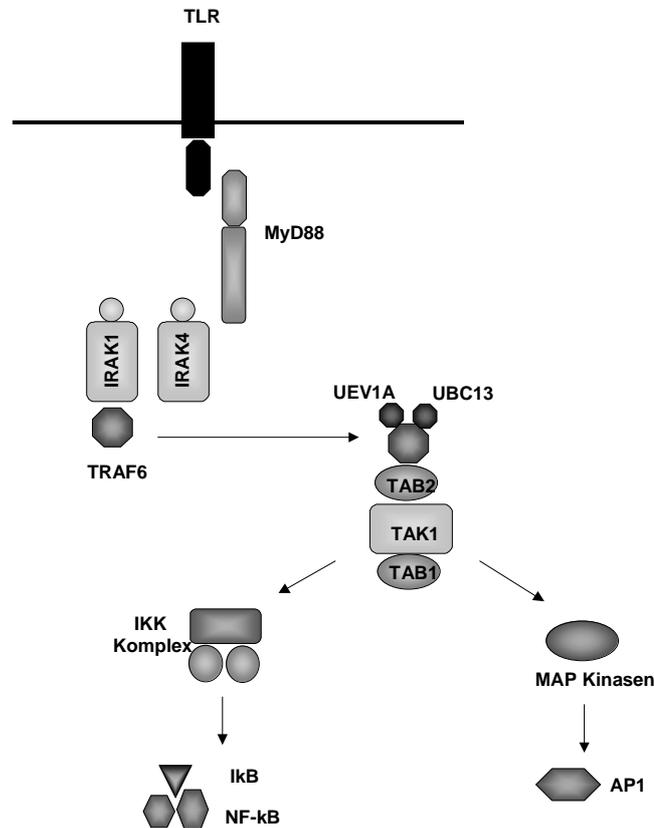


Abb. 1 MyD88-abhängige Signaltransduktion der TLR

Als erstem *TIR-domain-containing adaptor protein*, das nach MyD88 entdeckt wurde, wurden ursprünglich TIRAP die oben beschriebenen TLR4-vermittelten, MyD88-unabhängigen Effekte zugeschrieben. Es zeigte sich jedoch, dass diese Funktionen in TIRAP-defizienten Mäusen immer noch intakt sind und dass diese vielmehr MyD88-*knock-out* Mäusen ähneln. Außerdem zeigten TIRAP-*knock-out* Mäuse eine gestörte Zytokin-Produktion nach TLR2-Stimulation. Aufgrund dieser Ergebnisse wird heute davon ausgegangen, dass TIRAP ein essenzieller Bestandteil des MyD88-abhängigen Signalweges für TLR2 und TLR4 ist (Yamamoto, Sato et al. 2002). TRIF oder TICAM1 wurde von zwei verschiedenen Gruppen identifiziert, zum einen als weiteres Adaptormolekül mit TIR-Domäne, zum anderen als TLR3-bindendes Molekül

(Yamamoto, Sato et al. 2002), (Oshiumi, Matsumoto et al. 2003). TRIF vermittelt in MyD88-unabhängiger Weise nach Stimulation von TLR3 und TLR4 die Aktivierung von *interferon regulatory factor 3* (IRF3) und somit die Produktion von IFN- β (Yamamoto, Sato et al. 2003). TLR4 bedient sich also nach Aktivierung sowohl MyD88- als auch TRIF-abhängiger Signaltransduktionswege. Ein viertes Adaptormolekül mit TIR-Domäne, TRAM, wurde erst kürzlich über Sequenzhomologien identifiziert (Yamamoto, Sato et al. 2003). Experimente in *knock-out* Mäusen verweisen auf eine wichtige Rolle von TRAM in der MyD88-unabhängigen, TRIF-abhängigen Signalkaskade nach Stimulation von TLR4; Signaltransduktion durch TLR3 hingegen erscheint TRAM-unabhängig. Für TLR4 scheint also der Einsatz von vier verschiedenen Adaptormolekülen, die Signale über zwei Hauptwege, nämlich den MyD88-abhängigen und den TRIF-abhängigen Weg, zu vermitteln, dessen spezifische Wirkungen z.T. zu erklären. Interessanterweise wird die Induktion von Typ I Interferonen durch TLR3 und TLR4 über den MyD88-unabhängigen, TRIF-abhängigen Weg vermittelt, während die Induktion von IFN- α und IFN- β durch TLR7 und TLR9 MyD88-abhängig ist. (s. Abb. 2)

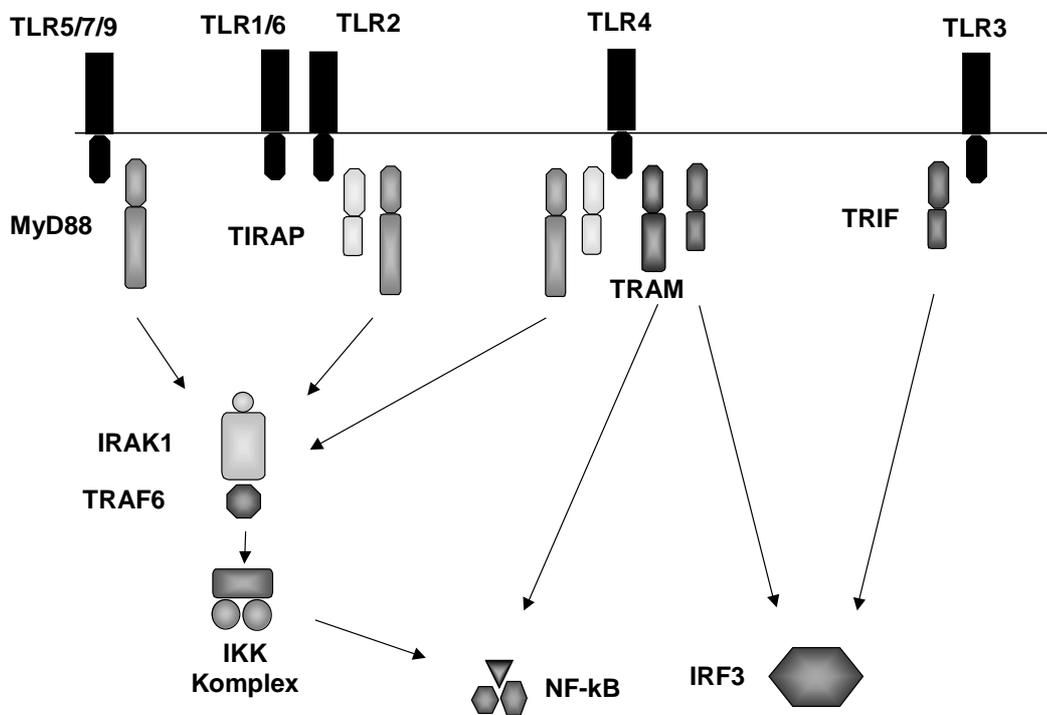


Abb.2 MyD88-unabhängige Signaltransduktion über TLR

Die gravierenden systemischen Auswirkungen einer unkontrollierten Aktivierung von TLR, wie sie z.B. am LPS-induzierten septischen Schock deutlich werden, bedingen die Notwendigkeit von negativen Regulatoren der involvierten Signaltransduktionswege. Zu den Molekülen, die in unterschiedlicher und z.T. noch ungeklärter Weise an dieser negativen Regulation beteiligt sind, zählen IRAK-M, *suppressor of cytokine signaling 1* (SOCS1), *MyD88 short* (MyD88s) und *single immunoglobulin IL-1R-related molecule* (SIGIRR). Neben den bereits erwähnten Signaltransduktionsmolekülen sind weitere Moleküle bekannt, die an der TLR-Signalkaskade beteiligt sind, auch wenn ihre genaue Funktion noch unbekannt ist. Zu erwähnen wären hier *Toll-interacting protein* (TOLLIP), die *pellinos*, die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), *evolutionary conserved signalling intermediate in Toll pathways* (ECSIT) und MAPKKK (Akira and Takeda 2004).

1.3 Signaltransduktion durch *mitogen-activated protein-Kinasen*

Der MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg gehört zu den ältesten Wegen der Signalübertragung und spielt neben vielen anderen physiologischen Prozessen auch in der Immunantwort eine wichtige Rolle. In Säugetieren werden die MAP-Kinasen in drei Gruppen eingeteilt, nämlich

- *extracellular signal-regulated protein kinases* (ERK)
- *p38 MAP Kinasen* (p38)
- *c-Jun NH₂-terminal kinases* (JNK).

Die Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgt durch Phosphorylierung und wird durch eine hoch konservierte Kaskade von Proteinkinasen vermittelt (s. Abb. 3), die als MAP-Kinasen Kinasen (MKK) bzw. MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen (MKKK) bezeichnet werden. Noch weiter stromaufwärts werden u.a. G-Proteine wie Ras durch die verschiedensten Stimuli aktiviert und setzen die Phosphorylierungskaskade in Gang; auch eine Aktivierung durch TLR ist bekannt (Dong, Davis et al. 2002). Die Substrate der MAP-Kinasen sind nicht streng zwischen den einzelnen Gruppen getrennt und umfassen weitere Proteinkinasen und andere Proteine in Zellmembran, Zytoplasma (wie z.B. Phospholipase A2, Hitzeschockproteine) und im Kern (wie Histone und Transkriptionsfaktoren) (Pearson, Robinson et al. 2001). Dabei bietet die mehrstufige Aktivierung über eine Signalkaskade zum einen die Möglichkeit der Beeinflussung durch andere Signalwege, zum anderen erfolgt auf diesem Wege auch eine Signalamplifikation.

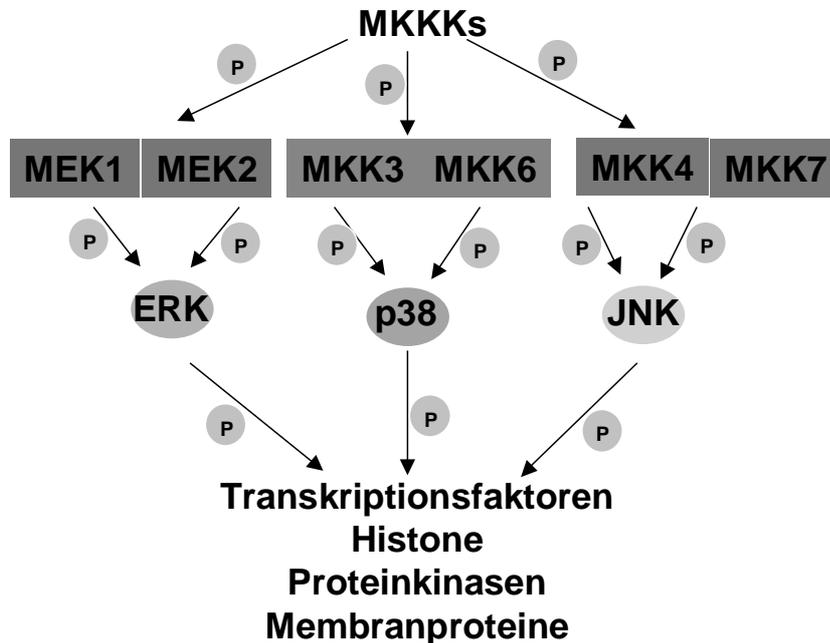


Abb. 3 Die Signalkaskade der MAP-Kinasen

1.4 Signaltransduktion über *Nuclear factor-κB*

Die Signalübertragung über NF-κB stellt einen weiteren, entwicklungsgeschichtlich sehr alten Signaltransduktionsweg dar, der sich durch besonders schnelle Aktivierung und einen außergewöhnlichen Regulationsmechanismus auszeichnet (Karin and Ben-Neriah 2000). Unter NF-κB wird eine Gruppe von dimeren Transkriptionsfaktoren zusammengefasst, die sich aus den Mitgliedern der NF-κB/Rel-Familie zusammensetzen und konservierte DNA-Sequenzen erkennen. Im humanen System sind bisher fünf Rel-Proteine identifiziert: p50, p52, c-Rel, RelA (p65) und RelB. Die verschiedenen Dimere unterscheiden sich in ihrer Affinität zu den DNA-Bindungsstellen sowie in ihrer Fähigkeit zur Aktivierung der Transkription, wobei auch Transkriptionshemmende Dimere beschrieben sind (Ghosh, May et al. 1998). Oft wird der Begriff NF-κB zur Beschreibung des Dimers p50/p65 verwendet, das am häufigsten in der Zelle vorliegt und starke Transkriptions-aktivierende Eigenschaften besitzt.

Die Regulation von NF-κB erfolgt über eine weitere Proteinfamilie, Inhibitor-κB (IκB), deren wichtigste Vertreter im humanen System IκBα, IκBβ und IκBγ darstellen (Whiteside and Israel 1997). Im nicht aktivierten Zustand liegen die NF-κB-Dimere und

I κ B als Komplexe im Zytoplasma vor, wobei die nukleäre Lokalisationssequenz von NF- κ B durch I κ B maskiert wird. Im Falle einer Aktivierung, die durch vielfältige Stimuli, wie z.B. Zytokine, mikrobielle Bestandteile, physikalischen und chemischen Stress, ausgelöst werden kann, wird durch die Phosphorylierung von I κ B dessen Ubiquitinylierung und Degradierung eingeleitet. Daraufhin transloziert NF- κ B in den Kern, um dort als aktivierender oder hemmender Transkriptionsfaktor aktiv zu werden. Diese Aktivität wird dadurch beendet, dass neu synthetisiertes I κ B in den Kern gelangt, aufgrund seiner hohen Affinität zu NF- κ B erfolgreich um dessen DNA-Bindung

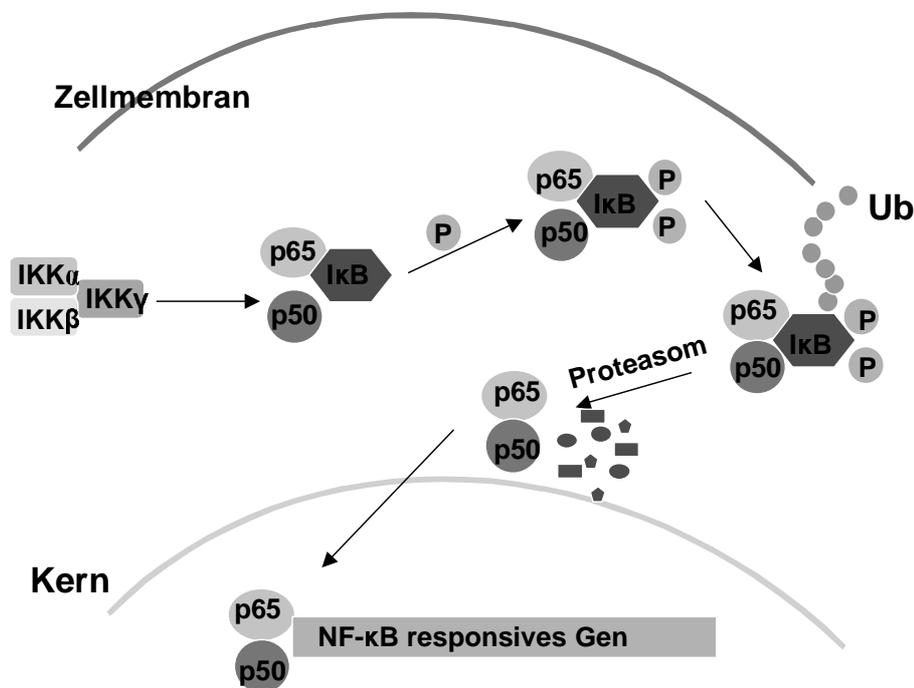


Abb. 4 NF- κ B Signaltransduktionsweg

konkurriert und der Komplex mit Hilfe der nukleären Exportsequenz (NES) von I κ B wieder ins Zytoplasma transloziert (Arenzana-Seisdedos, Turpin et al. 1997). Als verantwortlich für die I κ B-Phosphorylierung konnte ein Komplex aus mehreren Kinasen identifiziert werden, der als I κ B-Kinase (IKK) bezeichnet wurde (DiDonato, Hayakawa et al. 1997). Während dabei IKK α und IKK β als katalytische Untereinheiten dienen, werden IKK γ regulatorische Eigenschaften zugeschrieben. Aktivierung von IKK erfolgt

vermutlich ebenfalls durch Phosphorylierung, wobei u.a. Protein-Kinase C (PKC) und MAPKKK als aktivierende Kinasen beschrieben wurden (Lallena, Diaz-Meco et al. 1999), (Lin, Mu et al. 1998). (s. Abb. 4)

1.5 Typ-I-Interferone als Effektormechanismen der angeborenen Immunität

1.5.1 Die Familie der Interferone

Die Gruppe der Interferone (IFN) umfasst eine heterogene Gruppe von Zytokinen, die zusammen eine Vielfalt an biologischen Funktionen vermitteln. Sie gehört zur Klasse II der Familie α -helikaler Zytokine, die darüber hinaus auch IL-10 sowie mehrere IL-10-Homologe (IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26) einschließt (Donnelly, Sheikh et al. 2004). Während die verschiedenen IFN- α -Subtypen sowie IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ und IFN- ω zu den Typ-I-Interferonen gezählt werden, stellt IFN- γ das einzige Mitglied der Typ II Interferone dar. Für immunologische Vorgänge sind IFN- α und IFN- β sowie IFN- γ von besonderem Interesse; IFN- ϵ wird in der Plazenta und IFN- ω wird in Keratinozyten exprimiert. Erst vor kurzem wurde eine neue Klasse von Typ I Interferon-ähnlichen Zytokinen entdeckt, IFN- λ 1-3, die sich aber bezüglich Sequenz, Genort und Rezeptor von den Typ I Interferonen unterscheiden (Kotenko, Gallagher et al. 2003). Auch wenn prinzipiell jede Zelle die Fähigkeit zur Produktion von IFN- α und - β besitzt, stellt die PDC oder *interferon-producing cell* (IPC) mit einer bis zu 1000-fach höheren Menge an produziertem IFN- α und - β nach Stimulation durch virale und bakterielle Pathogene über PRR die Hauptquelle an Typ I IFN dar (s. unten). Dagegen wird Typ II IFN oder IFN- γ von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen produziert (Taniguchi, Ogasawara et al. 2001).

1.5.2 Typ-I-Interferone in der antiviralen Immunantwort

Den Typ-I-IFN wird eine besonders wichtige Rolle in der Abwehr viraler Infektionen zugeschrieben, obgleich auch die antibakterielle Abwehr beeinflusst wird. Die IFN- α/β -Produktion wird im frühen Stadium einer Infektion initiiert und entfaltet ihre Wirkung zum einen durch die Induktion einer direkten antiviralen Aktivität in Virus-befallenen Zellen und zum anderen durch die Beeinflussung einer Vielzahl von Prozessen der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Wie vielfältig und komplex die Effekte einer Stimulation des IFN- α/β -Rezeptors sind, veranschaulichen *microarray*-Analysen, die eine Beeinflussung der Expression hunderter Gene durch IFN- α/β zeigen (Der, Zhou et al. 1998).

Die direkte antivirale Aktivität der Typ I IFN besteht in der Blockierung verschiedener Schritte im Reifungszyklus eines Virus in der Zelle, die durch IFN-induzierte Proteine vermittelt wird. Dazu zählen Penetration und *uncoating*, die Transkription viraler mRNA, die Synthese viraler Proteine, die Replikation des Genoms sowie die Zusammensetzung und Freisetzung des Virions (Sen 2001). Neben den direkten IFN-Wirkungen scheint für die Modulation des Immunsystems der Induktion eines sog. *priming state*, der die Bereitschaft für die Induktion und Regulation anderer Mediatoren schafft, eine wichtige Rolle zuzukommen (Theofilopoulos, Baccala et al. 2005). So werden durch IFN- α/β die Produktion und Wirkung von IFN- γ (Cousens, Peterson et al. 1999), IL-6, IL-15 und TGF- β verstärkt (Brassard, Grace et al. 2002). Zu den Auswirkungen einer starken IFN- α/β -Produktion auf die adaptive Immunantwort zählen die Begünstigung der Aktivierung und Ausreifung von dendritischen Zellen (DC) mit einer verstärkten Fähigkeit zum *cross-priming* (Le Bon, Etchart et al. 2003), des Überlebens und der Proliferation aktivierter T-Zellen (Marrack, Kappler et al. 1999) sowie der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen (Lee, Rao et al. 2000). In B-Zellen wirkt IFN- α/β als Adjuvans für Antikörper-Produktion und *isotype switching* (Le Bon, Schiavoni et al. 2001) und verhindert Apoptose (Braun, Caramalho et al. 2002). Unter bestimmten Umständen können Typ I Interferone jedoch auch proapoptische, antiproliferative Effekte auf B- und T-Zellen ausüben (Chawla-Sarkar, Lindner et al. 2003).

1.5.3 Regulation der IFN- α/β -Transkription: *Interferon Regulatory Factors*

Einem einzigen IFN- β -Gen stehen im humanen System über 20 IFN- α -Gene gegenüber, die vermutlich durch Duplikation entstanden sind und die für 13 funktionelle Polypeptide kodieren. Die Rolle der verschiedenen IFN- α -Subtypen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Mittlerweile wird jedoch trotz eines weitgehend überlappenden Wirkprofils die Existenz individueller biologischer Funktionen unterschiedlicher IFN- α -Subtypen angenommen, die z.B. für die *IFN-inducible protein (IP)-10*-Induktion gezeigt werden konnten (Marie, Durbin et al. 1998). Weiterhin könnte das Vorhandensein eines ganzen Satzes an IFN- α -Genen eine erleichterte und differenziertere quantitative Regulation ermöglichen (Levy, Marie et al. 2002).

Typ I IFN aktivieren eine Reihe von Transkriptionsfaktoren und werden wiederum in ihrer Expression durch mehrere Transkriptionsfaktoren reguliert, die somit eine bedeutende Rolle in immunologischen Vorgängen spielen. Eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die auf verschiedenen Ebenen die Expression von IFN- α/β beeinflussen und deren Wirkungen vermitteln, stellen die *interferon regulatory factors* (IRF) dar. Mittlerweile sind neun Mitglieder der IRF-Familie bekannt, denen

unterschiedliche Aufgaben bei Immunreaktionen zukommen. Besondere Bedeutung in Zusammenhang mit Regulation und Wirkungen von Typ I IFN besitzen IRF-3, IRF-5 und IRF-7. IRF-3 und IRF-7 weisen bereits große Ähnlichkeiten in ihrer Primärstruktur auf. Während IRF-3 in den meisten Zellen unbeeinflusst durch Stimulation mit Pathogenen oder IFN konstitutiv exprimiert wird, hängt die Höhe der IRF-7 Expression stark von IFN- α/β -Signalen ab (Sato, Hata et al. 1998). Genaue Analysen der Promotorbindung der beiden IRF zeigten, dass IRF-3 stärker auf eine bestimmte Bindungssequenz festgelegt ist, die in dieser Form v.a. in den Promotoren von IFN- β und IFN- $\alpha 4$ vorkommt. Bei IRF-7 besteht eine größere Variabilität der Bindung (Lin, Genin et al. 2000).

1.5.4 Molekulare Mechanismen der IFN- α/β -Induktion

Die Aktivierung des IFN- β -Gens wird über die Bindung von Transkriptionsfaktoren an positive regulatorische Domänen, (PRDI, PRDII und PRDIV), vermittelt; die zugehörigen Transkriptionsfaktoren stellen dabei IRF-3, NF- κ B und *activating transcription factor (ATF)-2/c-Jun* dar, die durch kooperative Bindung und die Rekrutierung weiterer Koaktivatoren einen Komplex am IFN- β -Promotor bilden (Yie, Senger et al. 1999). Die durch mikrobielle Stimulation induzierbaren Aktivatoren dieser Transkriptionsfaktoren befinden sich normalerweise in inaktiver Form im Zytoplasma und setzen nach Phosphorylierung die Signalkaskaden in Gang, die über mehrere Zwischenschritte zur Transkription des IFN- β -Gens führen. Die verschiedenen IFN- α -Gene werden in differenzierter Weise durch unterschiedliche Stimuli exprimiert, wobei bisher nur eine Notwendigkeit verschiedener IRF bekannt ist. Grundlage der differenzierten Expression einzelner Subtypen bildet die unterschiedliche Empfindlichkeit ihrer Promotoren für die verschiedenen Mitglieder der IRF-Familie sowie ein komplexes Zusammenspiel verschiedener positiver und negativer regulatorischer Elemente (Levy, Marie et al. 2002).

Für die IFN- α/β -Induktion wird heute ein Modell angenommen, das zwei unterschiedliche Phasen der Induktion sowie einen positiven *feedback*-Mechanismus einschließt: Während der ersten Phase wird durch die Virus-abhängige Aktivierung von IRF-3 und weiterer Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung die Produktion von IFN- β und IFN- $\alpha 4$ induziert. Diese schnelle Sekretion kleiner Mengen an IFN setzt einen positiven autokrinen *feedback*-Mechanismus in Gang, der über Stimulation des IFNAR zur Produktion von IRF-7 führt. Erst diese Produktion und nachfolgende Aktivierung von IRF-7 ermöglicht die zweite oder späte Phase der IFN- α/β -Produktion, während derer nun große Mengen und ein breites Spektrum an IFN- α -Subtypen produziert werden können (s. Abb. 5). Angesichts der Tatsache, dass

Phosphorylierung von IRF-7 zu dessen Dimerisation führt und diese eine notwendige Voraussetzung für die weitere IFN- α -Induktion darstellt, wird eine Aktivierung der IFN- α -Promotoren durch IRF-Dimere angenommen (Marie, Smith et al. 2000); neben IRF-7- und IRF-5-Homodimeren haben hier auch IRF-3/IRF-7-, IRF-3/IRF-5- und IRF-5/IRF-7-Heterodimere Anteil an der weiteren Transkription (Au, Yeow et al. 2001). Dabei wird IRF-5 eine besondere Rolle zugeschrieben, da gezeigt werden konnte, dass die Kombination von IRF-5 und IRF-7 als Heterodimer hemmend auf die IFN- α -Produktion wirkt (Barnes, Field et al. 2003). Auch wird eine Beeinflussung der Expression der verschiedenen IFN- α -Subtypen, durch das Vorhandensein unterschiedlicher IRF-Dimere angenommen.

Der beschriebene Mechanismus der IFN- α -Induktion, der vorwiegend durch Untersuchungen an Fibroblasten gewonnen wurde, scheint so nicht auf die PDC übertragbar zu sein. Während in der PDC IRF-7 konstitutiv exprimiert wird, erwies sich IRF-3 als entbehrlich für die IFN- α -Induktion (Honda, Yanai et al. 2005). Ein positiver *feedback loop* scheint jedoch auch in der PDC für die Induktion großer Mengen an IFN- α erforderlich zu sein.

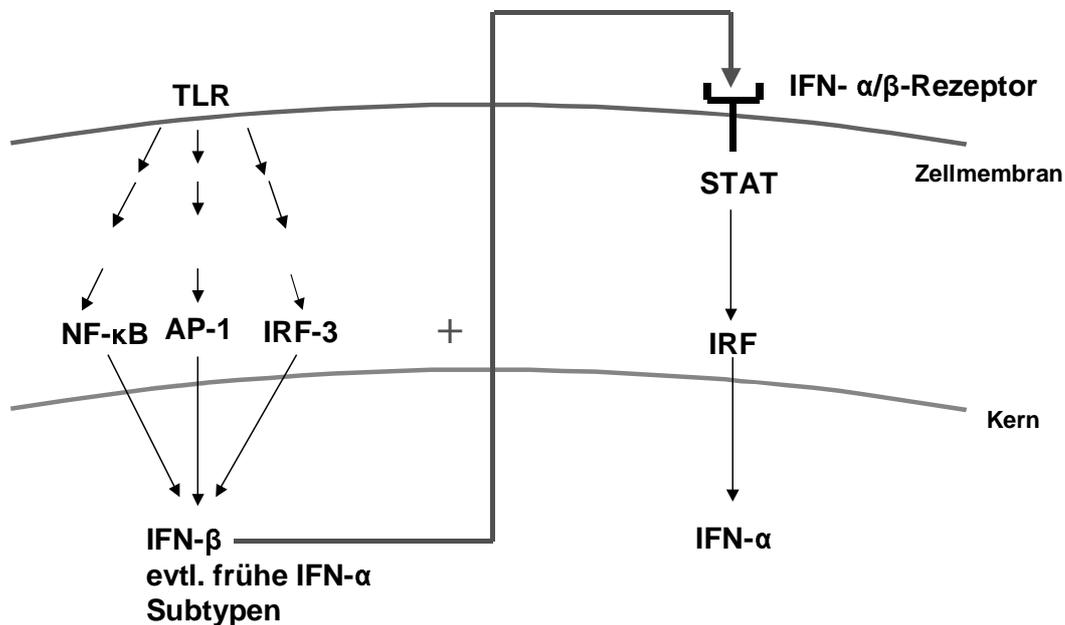


Abb.5 Molekulare Mechanismen der IFN- α/β -Induktion

1.5.5 Signaltransduktion über den IFN- α/β -Rezeptor

IFN- α und IFN- β binden an den gleichen, ubiquitär exprimierten Rezeptor, IFNAR. Dieser heterodimere Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, IFNAR1 und IFNAR2, von denen IFNAR2 als Bindungsstelle angesehen wird; beide Untereinheiten sind aber unerlässlich für eine funktionierende Signaltransduktion. Bindung von IFN- α/β induziert die Rezeptor-Dimerisation, der wiederum Autophosphorylierung sowie die Phosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Janus-Protein-Tyrosinkinasen Tyk2 (IFNAR1) und Jak1 (IFNAR2) folgen. Nach Phosphorylierung der intrazellulären IFNAR1-Domäne kommt es zur Bindung von *signal transducer and activator of transcription 2* (Stat2), das phosphoryliert wird und in Folge Stat1 rekrutiert und wiederum phosphoryliert. Das phosphorylierte Stat1/Stat2-Heterodimer dissoziiert vom Rezeptor ab und transloziert in den Kern, wo es zusammen mit dem *IFN regulatory factor 9* (IRF-9) den heterotrimeren Komplex *IFN-stimulated gene factor 3* (ISGF3) bildet. ISGF3 bindet an die regulatorischen Sequenzen (*IFN-stimulated response elements*, ISRE) der durch IFN- α/β -induzierbaren Gene (*IFN-stimulated genes*, ISG) und initiiert so deren Transkription. Neben dem beschriebenen existieren noch weitere Signaltransduktionswege für IFN- α/β , die u.a. die Bildung von Stat1-Homodimeren einschließen (Theofilopoulos, Baccala et al. 2005). Während das Set der ISG der verschiedenen Typ I IFN weitgehend identisch ist, scheinen so auch leichte Modifikationen zwischen den einzelnen Subtypen zu existieren (Rani, Leaman et al. 1999).

1.6 Immunstimulatorische DNA

1.6.1 CpG-Oligonucleotide als *pathogen-associated molecular patterns*

Zu den *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), die dem angeborenen Immunsystem die Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd ermöglichen, gehört der TLR9-Ligand CpG-DNA – DNA, welche die Nukleotid-Abfolge Cytosin-Guanosin in einem bestimmten Basen-Kontext enthält. Da auch humane Zellen DNA besitzen, müssen deutliche Unterschiede zu mikrobieller DNA bestehen, um die Kriterien eines PAMP als konservierter mikrobieller Struktur, die sich von humanen Strukturen unterscheidet, zu erfüllen:

- Während das Auftreten von CG-Dinukleotiden in humaner DNA unterdrückt wird und lediglich bei einem Viertel der statistischen Häufigkeit liegt, enthält die DNA der meisten Mikroorganismen CG-Dinukleotide gemäß der statistischen Wahrscheinlichkeit.

- In humaner DNA herrscht im Gegensatz zu mikrobieller DNA ein Basen-Kontext vor, in dem CG-Dinukleotide keine immunstimulatorische Aktivität besitzen, nämlich ein Cytosin vor und ein Guanosin nach der CpG-Sequenz.
- Ca. 70% der humanen CG-Dinukleotide sind methyliert, eine Modifikation, die ebenfalls der immunstimulatorischen Aktivität entgegenwirkt. (Krieg 2002)

Synthetische Oligodesoxynukleotide (ODN) besitzen eine mikrobieller DNA vergleichbare immunstimulatorische Aktivität. Da ODN instabile Strukturen sind, die schnell von Nukleasen abgebaut werden, werden bei der Herstellung von synthetischen ODN die normalen Phosphodiester-Bindungen teilweise oder vollkommen durch Phosphothioat-Bindungen ersetzt, welche den Molekülen Nuklease-Resistenz verleihen (Stein, Subasinghe et al. 1988). Im Laufe der Evolution haben sich die TLR9-Moleküle der verschiedenen Spezies auseinander entwickelt, so dass sich manche Spezies in den CpG-ODN-Sequenzen unterscheiden, die eine optimale stimulatorische Wirkungen entfalten (Rankin, Pontarollo et al. 2001). Während diese Sequenzen im Menschen und in anderen Primaten weitgehend übereinstimmen, bestehen deutliche Unterschiede zwischen Menschen und Nagern. Auch die TLR9-exprimierenden, CpG-responsiven Zellarten können zwischen verschiedenen Spezies differieren; so stellen im humanen System und im Primat B-Zellen und PDC die Zellarten dar, die direkt durch CpG-ODN aktiviert werden, wohingegen direkte CpG-Effekte im murinen System zusätzlich auch über myeloide Zellen wie Makrophagen, Monozyten und myeloide dendritische Zellen vermittelt werden (Kadowaki, Ho et al. 2001). In vivo Experimente mit CpG-ODN werden folglich typischerweise in Mäusen begonnen und besonders in Bezug auf therapeutische Anwendung zur weiteren Evaluation in Primaten verlegt.

1.6.2 Einteilung der CpG-Oligonukleotide: CpG-A und CpG-B

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Effekte auf PDC und B-Zellen wurden CpG-ODN verschiedenen Klassen zugeteilt: Während CpG-A-ODN eine starke IFN- α -Produktion in der PDC induzieren, führt Stimulation mit CpG-B-ODN zur Aktivierung von B-Zellen, aber nur zu einer geringen Produktion von IFN- α (Hartmann and Krieg 2000; Krug, Rothenfusser et al. 2001). In einer zweiten Einteilung, die von Klinman et al. vorgeschlagen wurde, werden D-Typ-ODN entsprechend CpG-A und K-Typ-ODN entsprechend CpG-B unterschieden, wobei die IFN- γ -Produktion in NK-Zellen, die IL-6-Produktion in Monozyten und die IgM-Synthese in B-Zellen der Einteilung zugrunde liegen (Gursel, Verthelyi et al. 2002). Auch wenn die Klasseneinteilung sich primär an den biologischen Eigenschaften und nicht an strukturellen Merkmalen der verschiedenen ODN orientiert, weisen die Vertreter der beiden ODN-Typen spezifische

Struktureigenschaften auf: Zu diesen gehören für Typ A ODN Poly-G-(Guanosin)-Motive mit Phosphothioat-Bindungen am 3` und 5` Ende sowie ein zentrales Palindrom, das ein CpG-Motiv enthält und durch Phosphodiester-Bindungen verknüpft ist. Den Prototyp eines humanen CpG-A-ODN stellt ODN 2216 dar. Aufgrund dieser strukturellen Besonderheiten formieren sich CpG-A-ODN zu übergeordneten Strukturen, den sog. G-Tetraden (Kerkmann, Costa et al. 2005). Diese liegen in der Größenordnung von Viren und erwiesen sich unter physiologischen Bedingungen als stabil. Die Bildung von Nanopartikeln beeinflusst die zelluläre Lokalisation von CpG-A mit einer längeren Verweildauer in endosomalen Kompartimenten (Honda, Ohba et al. 2005). Diese Eigenheit wird mittlerweile als verantwortlich für eine potente IFN- α -Induktion angesehen, da auch CpG-B-ODN, die experimentell zu höhermolekularen Strukturen zusammengefügt wurden, große Mengen an IFN- α induzieren. Im Gegensatz zu CpG-A enthält CpG-B ein oder mehrere CpG-Motive, keine Poly-G-Sequenz und ist ausschließlich durch Phosphothioat-Bindungen verknüpft (Krieg 2001). (s. Tab. 2)

Seit kurzer Zeit existiert eine dritte Klasse von CpG-ODN, CpG-C. Diese Klasse zeichnet sich sowohl durch IFN- α -Induktion in der PDC als auch durch Aktivierung von B-Zellen aus und vereint somit die Haupteigenschaften von CpG-A und CpG-B. Bezüglich der Aktivierung von B-Zellen in PBMC erwies sich CpG-C sogar als CpG-B

	CpG-A	CpG-B
primäre Zielzelle	PDC	B-Zelle
Prototyp	ODN 2216	ODN 2006
Sequenz	5`GGggg <u>acga</u> : <u>tcgtc</u> GGGGGg 3`	5` TCGTCG TTTTGT CG TTTTGT CGTT 3`
Struktur	<ul style="list-style-type: none"> • chimäres Phosphodiester-/Phosphorothioat-Rückgrat • Poly-G-Enden • zentrales Palindrom mit CG-Dinukleotid • Formation höhermolekularer Strukturen (G-Tetraden) 	<ul style="list-style-type: none"> • vollständiges Phosphorothioat-Rückgrat • enthält das „optimale“ humane CpG-Motiv GTCGTT
Wirkung	<ul style="list-style-type: none"> • induziert große Mengen IFN Typ I in PDC • schwache Aktivierung von B-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • starke Aktivierung von B-Zellen • induziert geringe Mengen IFN Typ I in PDCs

Tabelle 2 Charakteristika und Sequenzen der humanen CpG-Klassen

Großbuchstaben: Phosphothioat; Kleinbuchstaben: Phosphodiester

Fett gedruckt: CpG-Motive

Unterstrichen: Palindrome; : = Zentrum des Palindroms

überlegen, was durch die indirekte Stimulation durch induziertes IFN- α erklärt werden kann. Wichtige strukturelle Merkmale sind ein zentrales Palindrom in Anlehnung an CpG-A sowie ein TCGTCG-Motiv am 5'Ende in Anlehnung an CpG-B; dabei sind alle Basen durch Phosphothioate verbunden, was dem ODN eine größere Stabilität im Vergleich zu CpG-A verleiht (Hartmann, Battiany et al. 2003).

1.6.3 Wirkungen der CpG-Oligonukleotide auf das Immunsystem

Beim Menschen werden nur B-Zellen und PDC direkt durch CpG-ODN aktiviert. CpG-B-ODN stellen dabei einen extrem starken Stimulus für B-Zellen dar: Analog zu bakterieller DNA führt Stimulation mit CpG-B zum Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus, zur Zytokin-Produktion sowie zur verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle (Davis, Weeratna et al. 1998). Während die CpG-B-induzierte IL-6 Sekretion für die Produktion von IgM benötigt wird, stellt die IL-10-Induktion einen Mechanismus zur Gegenregulation und Begrenzung der Aktivierung dar (Anitescu, Chace et al. 1997). Neben dem Fc γ -Rezeptor werden kostimulatorische Moleküle wie *major histocompatibility complex* (MHC)II, *cluster of differentiation* (CD)80, CD86, CD40 und CD54 verstärkt auf der Zelloberfläche präsentiert. In reifen B-Zellen besteht ein ausgeprägter Synergismus von CpG-ODN-Stimulation und Stimulation des B-Zell-Rezeptors bezüglich Proliferation, antigen-spezifischer IgG-Produktion und IL-6-Produktion (Krieg, Yi et al. 1995). Zudem existiert ein NF- κ B-vermittelter anti-apoptotischer Effekt von CpG-B-ODN auf die B-Zelle (Yi, Chang et al. 1998). Zusammen mit CD40-Ligand induziert CpG-B hohe Mengen an IL-12, welches das *priming* naiver CD4 T-Lymphozyten und so die Entstehung von TH1-Zellen fördert (Gursel, Verthelyi et al. 2002).

Durch CpG-A-ODN kann keine der beschriebenen Wirkungen auf die B-Zelle erzielt werden; vielmehr scheint es den aktivierenden und protektiven Effekten von CpG-B entgegen zu wirken. In der PDC bewirkt die Aktivierung durch CpG-ODN das Wachstumsfaktor-unabhängige Überleben in Kultur, Schutz vor IL-4-induzierter Apoptose, verstärkte Oberflächenexpression von MHCII, CD80, CD86, CD40 und CD54, Produktion von Zytokinen (IL-6, TNF- α), IFN- α und Chemokinen sowie Ausreifung (starke Expression von CD83). Die Kombination mit CD40L führt zur Produktion von IL-12 p70 (Krug, Towarowski et al. 2001). Während CpG-B sich bei der PDC hinsichtlich Ausreifung, TNF- α -Produktion oder Aktivierung als gleichwertiger oder überlegener Stimulus erweist, besteht eine starke Diskrepanz zwischen der Fähigkeit beider ODN-Klassen zur-IFN- α Induktion; hier erweist sich nur CpG-A als potenter Stimulus für die PDC, der die Produktion von großen Mengen an IFN- α induziert. Zu den IFN- α -vermittelten sekundären Effekten von CpG-A auf das Immunsystem gehören

die Antigen-unabhängige Aktivierung von Gedächtnis-CD8-T-Zellen (Hornung, Rothenfusser et al. 2002), die Induktion einer erhöhten lytischen Aktivität und IFN- γ -Produktion in NK-Zellen (Gursel, Verthelyi et al. 2002), die Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen (Rothenfusser, Hornung et al. 2001) und die Ausreifung und Entwicklung eines DC-ähnlichen Phänotyps in Monozyten (Krug, Rothenfusser et al. 2003). (s. Abb. 6)

Zusammenfassend besteht die Wirkung von CpG-ODN in der Schaffung eines starken TH1-Milieus *in vitro* und *in vivo*, das sich durch die Anwesenheit von IFN und IL-12 auszeichnet.

1.6.4 Molekulare Wirkmechanismen der CpG-Oligonukleotide

Die Aufnahme von ODN in die Zelle erfolgt nach Anlagerung an DNA-bindende Proteine an der Zelloberfläche über Rezeptor-vermittelte Endozytose in einem aktiven, temperaturabhängigen, zu sättigenden und sequenzunabhängigen Prozess (Hacker, Mischak et al. 1998); in Anwesenheit von Poly-G-Motiven erfolgt zusätzlich eine Aufnahme über *scavenger* Rezeptoren (Yao, Corrias et al. 1996). CpG-ODN, die an Latex- oder Gold-Kügelchen gebunden sind und dadurch an der Aufnahme in die Zelle gehindert werden, verlieren ihre immunstimulatorische Wirkung (Manzel and Macfarlane 1999). Nach Aufnahme in die Zelle sind ODN in endosomalen Kompartimenten lokalisiert. Hier lassen sich wiederum durch Substanzen wie Chloroquin, welche die Ansäuerung und Ausreifung der Endosomen verhindern, die stimulatorischen Effekte von CpG-DNA aufheben (Yi, Tuetken et al. 1998). Nachdem die Erkennung über TLR9 zuerst in Mäusen als notwendige Voraussetzung für die Wirkung von CpG-ODN demonstriert werden konnte (Hemmi, Takeuchi et al. 2000), folgte bald die Bestätigung im humanen System; auch hier wurde TLR 9 als sowohl notwendige als auch hinreichende Voraussetzung für die Vermittlung der CpG-ODN-induzierten Effekte identifiziert (Bauer, Kirschning et al. 2001). In Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Konsequenzen einer Hemmung der Aufnahme von ODN in die Zelle oder einer Hemmung der endosomalen Ausreifung, konnte die Lokalisation von TLR9 in endosomalen Kompartimenten dargestellt werden (Ahmad-Nejad, Hacker et al. 2002).

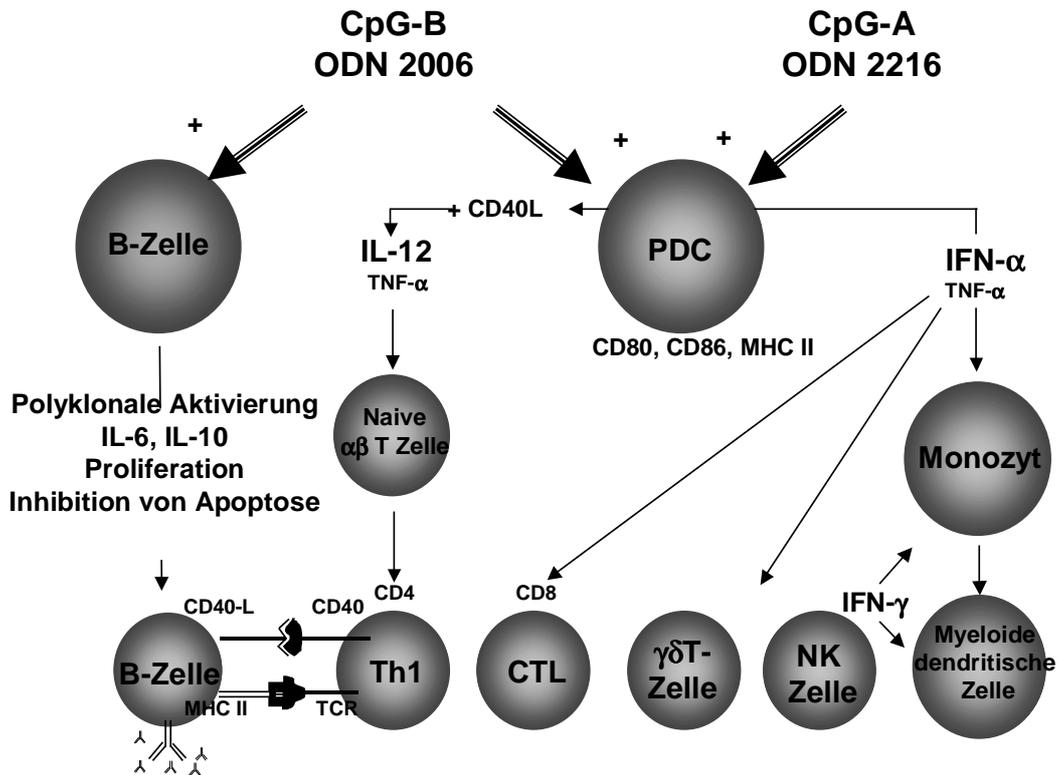


Abb.6 Wirkungen der CpG-ODN auf das Immunsystem (Rothenfusser, Tuma et al. 2002)

1.6.5 CpG-Oligonukleotide als Stimulans in der Immuntherapie

Es existieren verschiedene Ansätze, die TH1-gerichtete immunstimulatorische Wirkung der CpG-ODN therapeutisch zu nutzen. Die wichtigsten Ansatzpunkte bestehen dabei in der Tumorthherapie, der Stärkung des Immunsystems zur Infektabwehr, der Verbesserung der Immunantwort nach Vakzinierung und der Modifizierung der Immunreaktion in allergisch bedingten Erkrankungen.

Tumorthherapie: In verschiedenen Untersuchungen werden CpG-ODN als Monotherapie, als Adjuvans für Tumorstoffe und in Kombination mit spezifischen Antikörpern (zur Verstärkung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität) eingesetzt (Weiner, Liu et al. 1997), (Wooldridge, Ballas et al. 1997), (s. *abstract* Coley 2006). Als Monotherapie konnten Studien in Mäusen eine therapeutische Wirkung von CpG-ODN nachweisen, wobei CpG-A v.a. Effekte gegen Tumoren zeigte, die sensibel auf NK-Zell Aktivierung reagieren, wie Melanome, Kolon-Karzinome oder Mesotheliome, während die durch CpG-B vermittelte breitere Aktivierung des Immunsystems einen Rückgang von Lymphomen, Neuroblastomen oder Glioblastomen bewirkte (Ballas, Krieg et al. 2001).

Infektprotektive Aktivität: Die systemische Applikation von CpG-ODN in Mäuse verleiht Immunität gegen verschiedene Pathogene (Klinman, Conover et al. 1999). Ein entscheidender Beitrag zu diesem Schutz kommt dabei der PDC zu: So konnte in Experimenten mit Listerien-Infektionen gezeigt werden, dass PDC aus CpG-behandelten Spendern nicht-behandelten Empfängern Immunität verleihen, wohingegen PDC-depletierte Spenderzellen dies nicht vermögen (Ishii, Ito et al. 2005). Auch im immunsupprimierten, schwangeren oder neugeborenen Individuum scheinen CpG-ODN die Immunabwehr zu stärken (Verthelyi, Gursel et al. 2003), (Ito, Ishii et al. 2004).

Adjuvans für Vakzinierungen: Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die Verwendung von CpG-ODN als Impfadjuvans. Über die Induktion von TH1-proinflammatorischen Zytokinen und die Aktivierung und Ausreifung von Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) führt die Verabreichung von CpG mit verschiedenen Impfstoffen (z.B. gegen Influenza, Masern, Hepatitis B, Tetanus) zu einem Anstieg spezifischer Antikörper auf ein Vielfaches der Kontrolle ohne CpG (Moldoveanu, Love-Homan et al. 1998).

Prävention und Therapie von Allergien: Allergische Erkrankungen wie Asthma bronchiale werden durch eine starke Produktion von TH2-Zytokinen wie IL-4 und IL-5 vermittelt. Durch Induktion einer TH1-Immunantwort, wie sie durch Stimulation mit CpG-ODN erreicht wird, lässt sich dieser Prozess verhindern oder abschwächen (Santeliz, Van Nest et al. 2002).

Im Menschen werden aktuell vorrangig Phase I-Studien zur Evaluation der Arzneimittelsicherheit durchgeführt, die auch Frage nach einer erhöhten Gefahr von Autoimmunerkrankungen unter CpG-ODN behandeln. Erste Phase II-Studien konnten eine Verstärkung und Beschleunigung der Immunantwort auf die Hepatitis-B-Vakzine Engerix B zeigen (Klinman, Ishii et al. 2000).

1.7 Die plasmazytoide dendritische Zelle

1.7.1 Die Familie der dendritischen Zellen

Definitionsgemäß besitzen dendritische Zellen (DC) die Fähigkeit zum *priming* naiver T-Lymphozyten. Dadurch kommt dieser Familie in der Initiierung einer Immunantwort gegenüber eindringenden Pathogenen eine bedeutende Rolle zu. Durch eine dichte Abdeckung der verschiedenen Gewebe des Körpers werden Antigene über PRR erkannt und in die sekundären lymphatischen Organe transportiert, um dort den T-Zellen präsentiert zu werden. Dadurch kommt es – je nach Aktivierungszustand der DC – zur Induktion einer spezifischen Immunantwort oder zur Induktion von Toleranz. Denn die Aktivierung und klonale Expansion eines für das jeweilige Antigen spezifischen T-Lymphozyten, das *priming* naiver T-Lymphozyten, hat sowohl die Antigenpräsentation über MHC-Moleküle als auch das Vorhandensein kostimulatorischer Moleküle auf einer aktivierten APC zur Voraussetzung (Dhodapkar, Steinman et al. 2001). So entsteht über eine PAMP-getriggerte Aktivierung von T-Zellen durch die DC eine Verknüpfung zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Eine Voraussetzung dafür stellt die Expression eines breiten Spektrums an PRR durch die verschiedenen DC dar, welche die Erkennung verschiedener Pathogene gewährleistet.

1.7.2 Subpopulationen dendritischer Zellen: Myeloide dendritische Zelle und plasmazytoide dendritische Zelle

Die Familie der DC umfasst eine heterogene Gruppe von Zellen, die sich je nach Entwicklungsstufe und Herkunft in ihren spezifischen Eigenschaften und Funktionen unterscheiden, und deren Zuordnung zur Klasse der DC durch oben genannte funktionelle Charakteristika definiert ist. So existieren je nach Stadium der Differenzierung (a) Stammzellen im Knochenmark, (b) Vorläuferzellen im Blut und im lymphatischen Gewebe, die nach Aktivierung große Mengen an Zytokinen produzieren, (c) gewebsständige unreife DC mit der Fähigkeit zur Aufnahme von Antigenen, sowie (d) reife DC, deren Hauptaufgabe die Antigenpräsentation im sekundären lymphatischen Gewebe darstellt. Beim Menschen existieren mindestens zwei phänotypisch zu unterscheidende Subpopulationen an DC, die myeloide unreife CD11c⁺ DC (MDC) und die CD11c⁻ plasmazytoide DC (PDC) (O'Doherty, Peng et al. 1994). Die beiden Subpopulationen unterscheiden sich in der Expression myeloider und lymphoider Marker, in den benötigten Wachstumsfaktoren sowie im Profil der exprimierten PRR (Spits, Couwenberg et al. 2000). (s. Tab. 3)

1.7.3 Die Herkunft der Plasmazytoiden Dendritischen Zelle

Die PDC verdankt ihren Namen ihrer Plasmazell-ähnlichen Morphologie, die von ihrer Erstbeschreibung im Jahre 1958 (Lennert and Remmele 1958) bis 1998 angesichts fehlenden Wissens über die Funktion einen der wichtigsten Anhaltspunkte für die Einordnung und Erforschung der neu entdeckten Zellart darstellte. Die Frage nach der Funktion der PDC konnte 1998 durch den Beweis geklärt werden, dass es sich bei der PDC und der *interferon producing cell* (IPC), die seit den späten 70er Jahren als wichtigste IFN- α -produzierende Zelle im peripheren Blut bekannt war, um ein und denselben Zelltyp handelt (Siegal, Kadowaki et al. 1999). Während die PDC im Laufe ihrer Entdeckung verschiedenen Zellreihen zugeordnet wurde – eine Tatsache, die sich in der wechselnden Nomenklatur widerspiegelt: plasmazytoide T-Zelle, plasmazytoider Monozyt, plasmazytoide Zelle (Liu 2005) – wird heute am ehesten die Existenz einer eigenständigen hämatopoetischen Zelllinie angenommen, in deren Entwicklung aus hämatopoetischen Stammzellen FLT3L eine kritische Rolle spielt (Shigematsu, Reizis et al. 2004). In Einklang mit dieser These zeichnet sich die Zelloberfläche der PDC durch das Fehlen der Linien-spezifischen Oberflächenproteine wie Immunoglobulin und CD19 (B-Zelle), T-Zell-Rezeptor und CD3 (T-Zelle), CD14 (Monozyten), CD16 und CD56 (NK-Zellen) und CD11c (myeloide dendritische Zellen) aus.

Während fetale PDC aus den primären lymphatischen Organen Leber, Thymus und Knochenmark isoliert wurden, scheint im erwachsenen Organismus hauptsächlich das Knochenmark für die Neubildung verantwortlich zu sein (Blom, Ho et al. 2000). Von dort wandert die PDC in die T-Zell-Gebiete der sekundären lymphatischen Organe. Diese Migrationsweise ähnelt eher derjenigen von B- und T-Zellen als derjenigen anderer dendritischer Zellen, die typischerweise von ihrem Bildungsort in nicht-lymphatisches Gewebe wandern und von dort nach Aktivierung über die drainierenden Lymphwege in die Lymphknoten gelangen (Penna, Vulcano et al. 2002).

1.7.4 Funktionelle Charakteristika der Plasmazytoiden Dendritischen Zelle

Wie bereits beschrieben ist die PDC mit TLR7 und TLR9 als PRR ausgestattet; diese Spezialisierung auf die Erkennung mikrobieller Nukleinsäuren verweist auf eine besondere Rolle der PDC in der Abwehr von Viren, wohingegen die TLR-Ausstattung beispielsweise myeloider dendritischer Zellen eher der Abwehr von Bakterien zu dienen scheint (Liu 2005). Während praktisch jede kernhaltige Zelle geringe Mengen an IFN- α produzieren kann, ist die PDC auf die Produktion großer Mengen an Typ I

Phänotyp	Plasmazytoide dendritische Zelle	Myeloide dendritische Zelle
Myeloide Marker		
CD11b	-	+
CD11c	-	+
CD13	-	+
CD14	-	-
CD33	-	+
Lymphoide Marker		
Pre-Ta	+	-
Ig1-like 14.1	+	-
Spi-B	+	-
PRR		
TLR1	+	+
TLR2	-	+
TLR3	-	++
TLR4	-	+
TLR5	-	+
TLR6	+	+
TLR7	+	-
TLR8	-	++
TLR9	++	-
TLR10	+	+
Weitere Marker		
CD4	++	+
CD45RA	+	-
CD45R0	-	+
IL-3R	+++	+
GM-CSFR	+	+++
BDCA-2	+	-
BDCA-4	+	-
Funktion		
INF- α/β -Produktion	++++	+
IL-12-Produktion	-	++
Phagozytose	-	++

Tabelle 3 Charakteristika von myeloider und plasmazytoider dendritischer Zelle
(Banchereau, Briere et al. 2000; Hornung, Rothenfusser et al. 2002)

Interferon (3 bis 10pg/Zelle/24h) nach Aktivierung durch mikrobielle Nukleinsäuren spezialisiert (Siegal, Kadowaki et al. 1999). Der molekulare Mechanismus der IFN- α -Induktion ist in Fibroblasten gut untersucht und wurde im vorhergehenden Kapitel bereits beschrieben. Die Fähigkeit der PDC zur IL-12-Produktion bleibt weiterhin umstritten. Während bestimmte Studien eine IL-12-Produktion auf Stimulation mit LPS, CD40L sowie CpG-B und CD40L zeigen (Cella, Jarrossay et al. 1999), (Krug, Towarowski et al. 2001), postulieren andere Autoren eine strikt getrennte Spezialisierung von PDC und myeloiden dendritischen Zellen auf die Produktion von IFN- α bzw. IL-12 (Ito, Amakawa et al. 2004).

Nicht aktivierte PDC tragen wenig MHCII, CD80 und CD86 auf ihrer Oberfläche und besitzen nicht die Fähigkeit, T-Zellen zur Antigen-abhängigen Proliferation zu stimulieren. Es existieren aber zwei bekannte Wege, um die auf IFN- α -Produktion spezialisierte PDC zu einer professionellen Antigen-präsentierenden Zelle auszureifen: der IL-3-abhängige Weg sowie der IFN- α - und TNF- α -abhängige Weg. Nach Stimulation der PDC über TLR kommt es vor allem während der ersten 24 Stunden zur Produktion großer Mengen an IFN- α . Während der nächsten 48 bis 72 Stunden erfolgt die Ausreifung zu einer dendritischen Zelle, die in hohem Ausmaß MHCII, CD80 und CD86 auf ihrer Oberfläche präsentiert und weiterhin IFN- α produziert, wenn auch in kleineren Mengen. Außerdem besitzt diese reife dendritische Zelle die Fähigkeit, über einen IFN- α -abhängigen Weg naive allogene CD4 T-Zellen zur Proliferation und zur IFN- γ - und IL-10-Produktion anzuregen (Kadowaki, Antonenko et al. 2000). Phagozytose und Pinozytose werden bei der ausgereiften PDC nur in sehr eingeschränktem Maße beobachtet (Grouard, Rissoan et al. 1997). In Einklang mit dieser Beobachtung konnte bisher ein *priming* von CD8 T-Zellen durch CpG-aktivierte PDC nur für endogene Antigene und Peptide, aber nicht für exogene Antigene gezeigt werden – eine Tatsache, die wiederum auf die der Spezialisierung der PDC auf die antivirale Abwehr verweist (Salio, Palmowski et al. 2004). Eine weitere wichtige Rolle der PDC in der antiviralen Abwehr besteht in der Aktivierung von Monozyten und MDC durch Typ I IFN, welche wiederum eine starke T-Zell Antwort nach sich zieht (Liu 2005).

1.8 Fragestellung

CpG-Motive in mikrobieller DNA dienen als *pathogen-associated molecular pattern* der Erkennung eindringender Pathogene durch das angeborene Immunsystem und setzen eine fein abgestimmte und konzertierte Immunantwort in Gang. Mit CpG-Oligonukleotiden als synthetischen Imitaten mikrobieller DNA wurden während der

letzten Jahre potente Immunstimulatoren entwickelt, auf deren Einsatz besonders im Bereich der Tumorthherapie große Hoffnungen gesetzt werden. Vorarbeiten machten deutlich, dass CpG-ODN in Abhängigkeit von ihrer Sequenz eine funktionell heterogene Gruppe von Immunmodulatoren darstellen, die an Hand von strukturellen und funktionellen Merkmalen in unterschiedliche Klassen eingeordnet werden können. *In vivo*-Studien zu verschiedenen Anwendungen der CpG-ODN zeigten zudem, dass die Heterogenität dieser Gruppe zu verschiedenen therapeutischen Effekten führt. Dies muss bei der klinischen Anwendung bedacht werden und eröffnet dabei die Chance zur differenzierten Beeinflussung des menschlichen Immunsystems. Dieser bewusste therapeutische Einsatz verschiedener CpG-Klassen setzt jedoch eine genaue Kenntnis ihres Wirkungsprofils und, wenn möglich, das Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen voraus.

Zu Beginn dieser Arbeit waren zwei verschiedene CpG-ODN-Klassen, CpG-A und CpG-B, im humanen System an Hand ihrer unterschiedlichen Effekte auf das Immunsystem charakterisiert worden: Während CpG-A die Produktion großer Mengen an IFN- α in der plasmazytoiden dendritischen Zelle induziert, führt Stimulation mit CpG-B zu einer starken Aktivierung der B-Zelle und der PDC, jedoch nur zu einer geringen Produktion von IFN- α . 2003 wurde mit CpG-C eine dritte ODN-Klasse etabliert, welche die grundlegenden Eigenschaften von CpG-A und CpG-B auf sich vereint (Hartmann, Battiany et al. 2003). Die molekularen Mechanismen, über welche die unterschiedlichen Wirkungen der CpG-Klassen nach Bindung an TLR9 in endosomalen Kompartimenten vermittelt werden, waren jedoch noch ungeklärt.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand daher der Versuch, die spezifischen Effekte von CpG-A und CpG-B auf ihre Zielzellen auf funktioneller und molekularer Ebene genauer zu charakterisieren und damit Erklärungsmöglichkeiten für ihre unterschiedlichen Wirkungen aufzuzeigen. Dabei sollten in geeigneten *in vitro*-Modellen insbesondere folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Worin unterscheidet sich die IFN- α -Produktion in der PDC nach Stimulation mit CpG-A und CpG-B?
2. Welche Signalwege werden für die IFN- α -Induktion nach Stimulation mit CpG-ODN benötigt?
3. Lassen sich auf Signaltransduktionsebene die funktionellen Unterschiede zwischen CpG-A und CpG-B abbilden?
4. Lassen sich die unterschiedlichen Wirkungen von CpG-A und CpG-B durch eine spezifische Aktivierung bestimmter Signalwege erklären?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Reagenzien, Chemikalien und Geräte

2.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Bio-Plex Workstation	Fa. Bio-Rad (Hercules, USA)
Eismaschine	Fa. Ziegler (Isernhagen, D)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Gene Quant RNA/ DNA Calculator	Fa. Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Kamera Nikon F90X	Fa. Nikon GmbH (Düsseldorf, D)
Lamin Air (HB 244 8)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Light Cycler	Fa. Roche (Mannheim, D)
MidiMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Mikroskop (Axiovert 25)	Fa. Zeiss (Jena, D)
MiniMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Omnifuge 2 ORS	Fa. Heraeus (Hanau, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Photokammer	Fa. Kodak (Rochester, NY, USA)
Power Pac 200 Spannungsgerät	Fa. Biorad (München, D)
Thermocycler Modell T3	Fa. Biometra (Göttingen, D)
Thermocycler RoboCycler Gradient 40	Fa. Stratagene (Heidelberg, D)
Vortex VF2	Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)
Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)

2.1.2 Chemikalien

Agarose	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Bromphenolblau	Fa. Bio-Rad (Marnes la Moquette, Frankreich)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Formaldehyd	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Glycerol	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Glycin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Heparin-Natrium	Fa. Ratiopharm (Ulm, D)
Methanol	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Ortho-mune Lyse-Reagenz	Fa. Ortho-Clinical Diagnostics (Neckarsgünd D)
Phorbol Myristat Acetat (PMA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Polyacrylamid	Fa. Gibco/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ponceau Red Staining Solution	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	Fa. Bio-Rad (Marnes la Moquette, Frankreich)
To-Pro-3 Iodid(TOPRO-3)	Fa. Molecular Probes (Leiden, NL)

Tris	Fa. Bio-Rad (Marnes la Moquette, Frankreich)
Tris-Borat-EDTA (TBE)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Tween	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
β -Mercaptoethanol	Fa. Bio-Rad (Marnes la Moquette, Frankreich)

2.1.3 Materialien für die Zellkultur

Agar	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Biocoll Separationsmedium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Fötales Kälberserum (FCS)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Hefeextrakt	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Humanes AB-Serum	Fa. BioWhittaker (Wakersville, USA)
Humanes Serum Albumin (HSA)	Fa. Pharmacia & Upjohn (Erlangen, D)
Interleukin-3	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	Fa. PAA (Linz, A)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)	
1640 Medium	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Soc-Medium	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)
Trypton	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen, D), Falcon (Heidelberg, D), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB) und Corning (Corning, USA) bezogen.

2.1.4 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Zellkultur:

RPMI-Vollmedium:

100 IU/ ml Penicillin
100 μ g/ ml Streptomycin
1,5 mM L-Glutamin
10 Vol % FCS
in RPMI 1640-Medium

LB-Medium:

10g NaCl
10g Tryton
5g Hefeextrakt
ad 1000 ml H₂O (pH 7,4)

LB-Agar:

10g NaCl
10g Tryton
5g Hefeextrakt
15g Agar
ad 1000 ml H₂O (pH 7,4)

Erythrozyten-Lysepuffer:

Ortho-mune Lysereagenz
in PBS

MACS-Puffer:

2 mM EDTA
0,5 Vol % BSA
pH 7,2
in PBS

TE-Puffer:

10 mM Tris Chlorid
1 mM EDTA
pH 8,0
in Wasser

Molekularbiologische Methoden:

Lyse-/ Bindepuffer:

4,5 M Guanidiniumchlorid
50 mM Tris-HCl
30 Vol % Triton X-100
pH 6,6
in Wasser

DNase Inkubationspuffer:

1 M NaCl
20 mM Tris-HCl
10 mM MnCl₂
pH 7,0
in Wasser

Waschpuffer I:

5 M Guanidiniumchlorid
20 mM Tris-HCl
60 Vol % Ethanol
pH 6,6
in Wasser

Waschpuffer II:

20 mM NaCl
2 mM Tris-HCl
80 Vol % Ethanol
pH 7,5
in Wasser

Elutionspuffer:

Nuclease-freies
steriles Wasser

TBE-Puffer:

89 mM Tris-Borat

Blotpuffer:

30,2g Tris
144g Glycin
auf 1l auffüllen entspricht 10x Puffer
1:10 mit Wasser verdünnen + 10%
Methanol

Laemmli-Puffer :

50mM Tris/HCl pH = 7
20% Glycerol
2% SDS
5% β-Mercaptoethanol
0,02% Bromphenolblau
2 mM EDTA
pH 8,3
in Wasser

TRIS-buffered saline (TBS):

20mM NaCl
500mM Tris-HCl pH 8

2.1.5 Reagenziensätze

B Cell Isolation Kit
Bacterial Strain JM 109
BDCA-4 Cell Isolation Kit
Bio-Plex cell lysis kit
Bio-Plex phosphoprotein assay
Bio-Plex phosphoprotein reagent kit
DNA Sequencing Kit
E.Z.N.A Miniprep Kit

Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Fa. Promega (Mannheim, D)
Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Fa. Bio-Rad (Hercules, USA)
Fa. Bio-Rad (Hercules, USA)
Fa. Bio-Rad (Hercules, USA)
Fa. USB Europe GmbH (Staufen, D)
Fa. Peqlab (Erlangen, D)
Fa. Bender MedSystems (Wien,
Österreich)
Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Fa. PBL Biomedical Laboratories (New
Brunswick, USA)
Fa. Bender MedSystems (Wien,
Österreich)
Fa. Pharmingen/ Becton Dickinson
Fa. Promega (Mannheim, D)

First-Strand cDNA Synthesis Kit
High Pure RNA Isolation Kit
Human IFN-α ELISA Kit

IFN-α module set

Humaner Opteia IL-8 ELISA
pGEM-T vector system

2.1.6 Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Herkunft
Anti BDCA-4	BDCA-4	Miltenyi Biotec

Anti CD11c	CD11c	BD/ Pharmingen
Anti CD123	CDw123	BD/ Pharmingen
Anti CD19	CD19	BD/ Pharmingen
Anti CD80	CD80	BD/ Pharmingen
Anti CD86	CD86	BD/ Pharmingen
Anti HLA-DR	HLA-DR	BD/ Pharmingen
Lineage Cocktail 1	CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56	BD/ Pharmingen
Anti-phospho-p38MAPK (T180/Y182) :PE	phospho-p38MAPK (T180/Y182)	BD/ Pharmingen
Anti-phospho-p44//42MAPK Kinase (Thr 202/Tyr204) Antibody	Phospho-ERK1/ERK2 (Thr 202/Tyr204)	Cell Signaling Technology
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit secondary antibody	Rabbit Ig	Molecular probes
Anti-Stat1	Stat1	Cell Signaling
Anti-phospho-Stat1(Tyr 701) Antibody	Phospho- Stat1(Tyr 701)	Cell Signaling
Anti-phospho-Stat1(Ser 727) Antibody	Phospho-Stat1(Ser 727)	Cell Signaling
Hrp-conjugated secondary antibody goat anti-rabbit	Rabbit Ig	Bio-Rad

2.1.7 CpG-Oligodesoxynukleotide und PCR-Primer

Komplett oder teilweise Phosphorothioat-modifizierte ODNs wurden freundlicherweise von Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, USA) zur Verfügung gestellt. Kleine Buchstaben stehen für Verknüpfung durch Phosphorothioate, große Buchstaben für Verknüpfung durch Phosphodiester am 3'-Ende der Base. Fett gedruckt sind die jeweiligen CpG-Dinukleotide:

Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz (5' → 3')
ODN 2006	t cg t cg t ttt g tc g ttt g tc g tt
ODN 2216	ggGGG ACGATCGTC gggggG

PCR-Primer:

IFN- α Konsensus Primer Set AB Applied Biosystems (Weiterstadt, D)

Primer	Sequenz
Sense	5'-GTACTGCAGAATCTCTCITTICTCCTG-3'
Antisense	5'-GTGTCTAGATCTGACAACCTCCCAGGCACT-3'

2.1.8 Inhibitoren

Bezeichnung	Spezifität	Hersteller
SB 203580	p38	Calbiochem
JNK Inhibitor	JNK	Calbiochem
PD 98059	MEK	Calbiochem
NF- κ B SN50, Cell Permeable Inhibitor Peptide	NF- κ B	Calbiochem
Anti-human IL-10-antibody	IL-10	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, D)

2.1.9 Western Blot

Chemilumineszenz	Fa. Amersham (Orsay, Frankreich)
Marker LC5925 See Blue +2	Fa. Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Milchpulver	Fa. Régilait (Saint Martin Belle Roche, Frankreich)
Nitrozellulose-Membran	Fa. Schleicher & Schuell (Dassel, D)
X-Omat R Film	Fa. Kodak (Stuttgart, D)

Die Plastikmaterialien (Gelkammern, Blotkammern, Käbme) für den Western Blot wurden von der Firma Bio-Rad (Marnes la Moquette, Frankreich) bezogen.

2.2 Zellulär-immunologische Methoden

2.2.1 Aufreinigung von Zellpopulationen

2.2.1.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Periphere mononukleäre Zellen wurden entweder aus 200 ml heparinisierem Vollblut gesunder Spender (pro 10 ml Blut 100 µl Heparin) oder aus *buffy coats*, die vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Greifswald zur Verfügung gestellt wurden, isoliert. Als *buffy coat* bezeichnet man die Leukozytenmanschette, die man beim Abzentrifugieren von Vollblut erhält. Diese besteht aus den plasmafreien zellulären Bestandteilen des Blutes mit einem reduzierten Gehalt an Erythrozyten.

Hierzu wurde das Blut auf sechs bzw. drei Röhrcben à 50 ml verteilt (Vollblut bzw. *buffy coats*), die mit 0,9 % sterilem NaCl aufgefüllt wurden. Dieses verdünnte Blut wurde nun langsam in acht bzw. vier Röhrcben à 50 ml geschichtet, die zuvor mit je 15 ml Ficoll-Hypaque gefüllt worden waren, ohne dass sich dabei die beiden Phasen vermischten. Nach Zentrifugation (666 g, 20 °C, 30 min, Beschleunigung 1, Bremsung 1) fand man in jedem *blue cap* von oben nach unten die folgende Schichtung vor: Plasma, Ring aus mononukleären Zellen, Ficoll, Erythrozyten. Der PBMC-Ring wurde vorsichtig abpipetiert, in ein neues *blue cap* gegeben, mit NaCl auf 50 ml aufgefüllt und wiederum zentrifugiert (520 g, 20 °C, 15 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Zellpellets resuspendiert und in ein Röhrcben gepoolt, wiederum mit NaCl auf 50 ml aufgefüllt und erneut abzentrifugiert (400 g, 4 °C, 10 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Vor dem letzten Waschschriff wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Zuletzt wurde das Zellpellet in dem gewünschten Kulturmedium aufgenommen, die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer und Trypanblaufärbung gezählt und auf die gewünschte

Konzentration verdünnt. Es wurden nur solche mononukleäre Zellfraktionen weiterverwendet, von denen über 95 % den Supravitalfarbstoff Trypanblau dank intakter Zellmembranen ausschlossen.

2.2.1.2 Aufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung

Bei der *magnetic activated cell sorting* (MACS)-Isolationsmethode werden Zellen mit speziellen Antikörpern markiert, die an paramagnetische Mikropartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt sind. Nachdem die Zellen für 15 min in einem speziellen MACS-Puffer bei 4 °C mit den *microbeads* markiert wurden, werden sie gewaschen und anschließend in MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wird die markierte Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält. Die Säule wird in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten eingebracht und somit alle mit *microbeads* beladenen Zellen in der Matrix zurückgehalten. Alle unmarkierten Zellen werden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt, so dass nur die gewünschte Zellpopulation in der Säule zurückgehalten wird. Anschließend lässt sich die markierte Zellpopulation außerhalb des Magnetfelds aus der Säule eluieren. Sowohl die markierte als auch die unmarkierte Zellfraktion lässt sich anschließend in Kultur nehmen. Das MACS-System kann entweder zur Anreicherung (positive Selektion) oder zum Ausschluss einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden. Zur Aufreinigung nach der MACS-Methode wurden in dieser Arbeit ausschließlich Reagenziensätze der Firma Miltenyi Biotec nach dem entsprechendem Hersteller-Protokoll verwendet.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 %igen CO₂/Luftgemisch. Sämtliche Experimente und Manipulationen mit Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblauausschlusstest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, tote Zellen werden blau

angefärbt. Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.2.3. Kultivierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die aufgereinigten Zellpopulationen wurden in 96-well-Rundboden-Platten in RPMI-Vollmedium mit 8 % AB-Serum kultiviert. Die Zellkonzentration wurde, falls nicht anders angegeben, auf 250.000 PDC oder 1 Mio. B-Zellen pro Milliliter eingestellt.

2.2.2.4 Kultur unter Stimulationsbedingungen

Zu den aufgereinigten Zellpopulationen wurde CpG-ODN in einer Konzentration von 3 µg/ml bzw. CpG-ODN und IL-3 (50 ng/ml) gegeben; als Negativkontrolle diente dabei die Kultur in reinem Medium bzw. in Medium mit IL-3.

2.2.2.5 Durchführung der Kinetiken

Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufes der Zytokin-Produktion und der Zell-Aktivierung wurden die verschiedenen Stimulationsbedingungen und Kontrollen gleichzeitig angesetzt; zu den angegebenen Zeitpunkten wurden dann die Überstände der Zellkultur zur Zytokin-Bestimmung mittels ELISA abgenommen und die Zellen zur flowzytometrischen Analyse aufbereitet.

2.2.2.6 Kultur in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren

Um die Auswirkungen einer Blockierung verschiedener Signaltransduktionswege und Zytokine zu beurteilen, wurden entsprechende Inhibitoren der Kultur aufgereinigter Zellpopulationen unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen zugefügt. Um eine sofortige Inhibition zu gewährleisten, wurden die Inhibitoren bereits 30 Minuten vor Stimulation mit CpG-ODN zugegeben. Die Auswahl der Inhibitor-Konzentrationen orientierte sich zum einen an den Empfehlungen des Herstellers; zusätzlich wurde die Effektivität der Hemmung anhand von Konzentrationsreihen und geeigneten Kontrollen sicher gestellt, sowie eine Toxizität der verwendeten Konzentration durch PI-Färbung im FACS ausgeschlossen (siehe unten).

2.2.3 Durchflusszytometrie

2.2.3.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie mittels eines *fluorescence-activated cell sorters* (FACS) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand ihres Phänotyps zu unterscheiden und zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ein entsprechendes Oberflächenantigen oder ein intrazelluläres Molekül markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom hintereinander einzeln 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) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht) gesammelt und photometrisch detektiert wird. Das Vorwärtsstreulicht wird wesentlich durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Die gewünschte Zellpopulation wird anhand dieser Kriterien ausgewählt und weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Der Laserstrahl regt das Chromophor der für die Markierung von Oberflächenproteinen oder intrazellulären Molekülen verwendeten Antikörper zur Emission von Lichtquanten an, die durch eine Linse gesammelt werden. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Moleküle.

Bei der direkten Immunfluoreszenz werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, die direkt an die entsprechenden Moleküle binden. Bei dem Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz werden die Zellen in einem ersten Schritt mit einem unmarkierten Antikörper inkubiert und erst in einem zweiten Schritt mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gefärbt, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörper gerichtet ist.

Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überlappen. Diese Überlappung wird durch Kompensation korrigiert, indem von jedem registrierten Fluoreszenzsignal der Anteil abgezogen wird, der durch Überlappung entsteht. Hierzu werden bei jedem Versuch Kontrollproben hergestellt, die jeweils nur mit einem bestimmten Fluorochrom angefärbt sind, während die anderen Fluorochrome, gebunden an geeignete Isotypen-Antikörper, als Negativkontrolle

dienen. Hierbei wird sichtbar, wie stark ein bestimmtes Fluorochrom in die anderen Kanäle hineinstrahlt und ermöglicht so die Kompensation. Ebenso kann mit Hilfe der Isotypen die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle so justiert werden, dass sich Zellen mit entsprechenden Antigenen bzw. Eigenschaften qualitativ und quantitativ unterscheiden und vergleichen lassen.

Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und die dazugehörigen maximalen Emissions- und Exzitations-Wellenlängen:

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitation	Emission
Fluorescein-Isocyanat (FITC)	494 nm	518 nm
Phycoerythrin (PE)	565 nm	575 nm
Propidiumiodid (PI)	536 nm	617 nm
Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm
TOPRO-3	642 nm	661 nm
Peridinin Chlorophyll-A-Protein (PerCP)	488 nm	675 nm

2.2.3.2 Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Für FACS-Analysen wurden 5×10^4 bis 2×10^5 Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen im zurücklaufenden Tropfen resuspendiert. Zur Färbung wurden die Zellen daraufhin 15 min bei 4°C unter Lichtausschluss mit FITC, PE, PerCP oder APC gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) bzw. einem unmarkierten Antikörper (indirekte Fluoreszenz) inkubiert und anschließend mit PBS einmal gewaschen. Bei indirekter Fluoreszenz wurde anschließend der Inkubationsschritt, diesmal mit einem fluoreszenzgekoppeltem Isotyp-spezifischem Antikörper, wiederholt. Wenn nötig wurde PI oder TOPRO-3 zur Anfärbung toter Zellen kurz vor der FACS-Analyse hinzugegeben. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde auf einem FACSCalibur gemessen und anschließend mit Hilfe der Cell Quest Software analysiert.

2.2.3.3 Bestimmung von intrazellulären Molekülen

Zur Messung intrazellulärer Moleküle wurden die zu untersuchenden Bedingungen bereits in FACS-Röhrchen angesetzt und inkubiert, da es sich nur um sehr kurze Inkubationszeiten handelte. Die Zellen wurden zunächst in 10 % Formaldehyd für 10 Minuten bei 37°C fixiert, wodurch die intrazellulären Reaktionen gestoppt werden und die Zelle in ihrem momentanen Zustand „konserviert“ wird. Daraufhin wurden die Zellen mit 90 % Methanol für mindestens 30 min auf Eis oder über Nacht bei -20°C

permeabilisiert, um die Zellmembranen für Antikörper durchlässig zu machen. Nach zwei Waschschrritten (PBS mit 5 % FCS) wurde der entsprechende Fluoreszenz-Antikörper bzw. bei der indirekten Immunfluoreszenz ein nicht-fluoreszierender Antikörper für die intrazelluläre Messung hinzugegeben. Nach einer Inkubationsphase von 30 bzw. 60 min bei RT wurden die Zellen erneut mit Waschpuffer gewaschen. Für die indirekte Immunfluoreszenz erfolgte daraufhin die Inkubation mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper für 15 Minuten bei Raumtemperatur und ein weiterer Waschschrtritt. Die Analyse wurde dann wie oben für die Bestimmung von Oberflächenmolekülen beschrieben durchgeführt.

2.2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zur Bestimmung verschiedener Proteine im Überstand von Zellkulturen wurde ein ultrasensitiver *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt. Hierzu werden Zell-freie Kultur-Überstände abgenommen und bei Bedarf entsprechend mit Medium verdünnt. Neben einer Standardreihe mit bekannter Proteinmenge werden nun alle Proben in *wells* pipettiert, die mit einem Protein-spezifischen Antikörper beschichtet sind. Während der zwei-stündigen Inkubationszeit bindet das vorhandene Protein an die Antikörper. Nach mehreren Waschschrritten wird nun ein zweiter, biotinylierter Antikörper zugegeben, der das bereits gebundene Protein an einem anderen Epitop bindet, sowie ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, welches an Biotin bindet. Durch Verwendung mehrerer Biotin-Streptavidin-Brücken pro Antikörper, wird eine Signalverstärkung und somit eine höhere Sensitivität erreicht. Nach Entfernung des ungebundenen Konjugates durch einen weiteren Waschschrtritt gibt man die Substratlösung hinzu; welche durch das gebundene Enzym zu Farbstoff umgesetzt wird. Die Farbintensität, die proportional zur Protein-Konzentration der Probe ist, wird dann mittels eines Absorptions-ELISA-Readers eingelesen. Durch die Standardreihe besteht die Möglichkeit, die genaue in der Probe enthaltene Konzentration zu errechnen.

Die kommerziell erhältlichen IFN- α -ELISA-Kits unterscheiden sich bezüglich ihres Spektrums an detektierten IFN- α -Subtypen. Für die meisten Messungen in dieser Arbeit wurde das IFN- α *module set* (Bender MedSystems; *detection range* 8 pg/ml - 500 pg/ml) verwendet; dieser ELISA erkennt die meisten Subtypen, jedoch nicht IFN- α B und IFN- α F. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch diese Einschränkung auszuschließen, wurden Kontrollmessungen mit Hilfe des *human IFN- α multi-subtype* ELISA, (*detection range* 100 pg/ml bis 5000 pg/ml; PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, USA) durchgeführt.

2.2.5 Bio-Plex-*Phosphoprotein*-Assay

Die Bio-Plex-Technologie stellt ein System zur simultanen Analyse von mehreren verschiedenen Molekülen (z. B. Proteine, Nukleinsäuren) aus einer Probe dar. Grundlage bilden dabei Fluoreszenz-gefärbte Mikrosphären, die in einem laminaren Flüssigkeitsstrom hintereinander durch zwei Laserstrahlen geführt werden.

Monoklonale Antikörper gegen die zu analysierenden Substanzen – in unserem Fall verschiedene Phosphoproteine - werden an je eine Farbgruppe von Polystyren-Kügelchen gekoppelt; diese Kügelchen sind mit verschiedenen Verhältnissen zweier Fluorophore gefärbt, die nach Anregung im Laserlicht durch Analyse des emittierten Spektrums eine eindeutige Zuordnung des gebundenen Antikörpers ermöglichen. Nach Zugabe der Antikörper-gekoppelten Mikrosphären zu lysiertem Zellmaterial kommt es zur Bindung der in der Probe enthaltenen Phosphoproteine an die Mikrosphären, die nunmehr als farbkodierte Trägermoleküle dienen. Im folgenden werden biotinylierte Detektionsantikörper zugegeben, die wiederum spezifisch, aber an anderen Epitopen an die verschiedenen Phosphoproteine binden. Diese werden durch Zugabe von Streptavidin-Phycoerythrin (Streptavidin-PE) Fluoreszenz-markiert.

Werden nun die beladenen Mikrosphären im laminaren Flüssigkeitsstrom durch die Laserstrahlen geführt, können durch Analyse der ausgesandten Wellenlängen Art und Menge der gebundenen Phosphoproteine ermittelt werden: Die Farbe des Polystyren-Kügelchens kodiert für das jeweilige Phosphoprotein, die Intensität des PE-Signals lässt mit Hilfe einer Standardkurve auf die Menge des gebundenen Proteins rückschließen.

Die Analyse wurde gemäß des Protokolls des Bio-Plex *phosphoprotein assay* durchgeführt und mit Hilfe der zugehörigen Software ausgewertet.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Quantitative Bestimmung der Expression verschiedener IFN- α -Subtypen

Während die Gesamtmenge an produziertem IFN- α unkompliziert im ELISA zu bestimmen ist, stellt die Differenzierung zwischen den verschiedenen IFN- α -Subtypen eine größere methodische Herausforderung dar. Auf Proteinebene ist der Nachweis mit Hilfe spezifischer Antikörper beschrieben (Greenway, Overall et al. 1992) sowie die Bestimmung mittels biochemischer Methoden wie der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) oder der Proteinsequenzierung (Nyman, Tolo et al. 1998). Auf RNA-Ebene kann die Bestimmung z. B. durch *real-time* PCR (rt PCR) erfolgen

(Loseke, Grage-Griebenow et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Ansatz gewählt, bei dem Gesamt-IFN- α amplifiziert und kloniert wird und durch Sequenzierung einer großen Anzahl an Klonen Rückschlüsse auf die Subtypen-Zusammensetzung der ursprünglichen RNA-Mischung gezogen werden (Yeow, Au et al. 2000).

Dazu wurde die RNA isoliert und revers in cDNA transkribiert. Mit Hilfe von Konsensus-Primern, die an konservierte Abschnitte der IFN- α -Sequenz binden, wurden durch PCR alle IFN- α -Subtypen amplifiziert und nach Auftrennung auf einem Agarose-Gel dargestellt. Das PCR-Produkt wurde kloniert. Unter der Annahme, dass jeder Bakterienklon genau einen IFN- α -Subtyp produziert, wurden für jede Bedingung 50 Klone ausgewählt; der exprimierte IFN- α -Subtyp wurde durch Sequenzierung bestimmt.

2.3.1.1 Extraktion zytoplasmatischer RNA

Zur Extraktion zytoplasmatischer RNA wurde der *high pure RNA isolation kit* verwendet. Dabei wurden je 200.000 Zellen/Bedingung/Spender in kaltem PBS gewaschen, die gleichen Bedingungen verschiedener Spender gepoolt und anschließend in 200 μ l PBS resuspendiert. Durch Zugabe von 400 μ l eines Lyse-/Bindepuffers erfolgte die Lyse der Zellen und die gleichzeitige Inaktivierung von RNasen. Die Probe wurde anschließend auf eine Säule mit einem Glasfaservlies gegeben und 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Da nur Nukleinsäuren in dem Glasfaservlies der Säule hängen bleiben, wurde der Durchlauf verworfen. Danach wurde die zurückgebliebene DNA durch Zugabe von 100 μ l DNase-Lösung für 15 min bei RT verdaut. Die verdaute DNA und die DNase wurde durch drei Waschschriffe aus dem Vlies der Säule entfernt: Erst wurde 500 μ l Waschpuffer I hinzugegeben und 15 s bei 8000 g zentrifugiert, dann wurde 500 μ l Waschpuffer II hinzugegeben und wiederum 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Schließlich wurde ein letzter Zentrifugationsschritt mit 200 μ l Waschpuffer II für 2 min bei 13.000 g durchgeführt. Letztlich konnte die RNA aus dem Glasfaservlies eluiert werden. Hierzu wurde 50 μ l Elutionspuffer auf die Säule pipetiert und anschließend die RNA durch eine Zentrifugation für 1 min bei 8000 g aus dem Vlies herausgelöst. Die extrahierte RNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.3.1.2 Reverse Transkription

Um über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden zu können, musste die RNA revers transkribiert werden und in einen cDNA (*copy-DNA*-) Einzelstrang umgeschrieben werden. Hierzu wurde der *First-Strand cDNA Synthesis Kit* von Roche Diagnostics verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden

Reagenzien in der Endkonzentration zusammen: 10 mM Tris, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM *Deoxynucleotide Mix*, 0,04 A₂₆₀ U *Oligo-p(dT)₁₅ primer*, 50 U *Rnase-Inhibitor* und 20 U AMV Reverse Transkriptase.

8,2 µl der gewonnenen RNA wurden mit 11,8 µl des First-Strand Reaktionsmixes für 10 min bei 25 °C inkubiert und anschließend für 60 min auf 42 °C erhitzt. Um eine Interferenz der AMV Reversen Transkriptase mit der folgenden PCR auszuschließen, wurde der Reaktionsansatz am Ende für 5 min auf 99 °C erhitzt um die AMV zu denaturieren. Die gewonnene cDNA wurde durch Zugabe von bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 µl gebracht und die gewonnene cDNA so als Ausgangssubstanz für die PCR verwendet.

2.3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Das Verfahren der PCR ermöglicht es, ein spezifisches DNA-Stück aus einem komplexen Nukleinsäuregemisch zu amplifizieren. Diese spezifische, zu amplifizierende DNA-Matrize wird hierbei auch als *template* bezeichnet. Die Reaktion erfolgt mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und einem sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaar, das den Enden des *templates* homolog ist. Die Reaktion durchläuft drei Schritte: 1. Denaturierung und bei doppelsträngiger DNA Aufschmelzen der beiden Stränge der Matrizen-DNA (Denaturierung), 2. Spezifische Hybridisierung der Primer an die homologe Zielsequenz auf der DNA (Anlagerung) und 3. Von den Primern ausgehende DNA-Synthese (Elongation). Das so synthetisierte DNA-Fragment kann in der darauffolgenden Amplifikationsrunde als Matrize für den anderen Primer dienen. Dadurch ist in mehreren aufeinander folgenden Zyklen eine exponentielle Anreicherung einer beliebigen DNA-Sequenz, die zwischen den beiden Primern liegt, möglich.

Die *nested* PCR („verschachtelte PCR“) stellt ein modifiziertes PCR-Verfahren zur Amplifikation kleiner Mengen an Template dar. Dabei werden für eine zu amplifizierende Sequenz zwei Primerpaare verwendet, wobei das zweite Sense- und Antisense-Primerpaar innerhalb der Sequenz liegt, die durch das erste Paar begrenzt wird. In einer ersten Runde wird nun mit Hilfe des ersten Primerpaares die längere Sequenz amplifiziert, die dann in der zweiten Runde als *template* verwendet wird. Dadurch dass der zweite Primer an einer anderen Stelle der DNA bindet, wird eine höhere Spezifität erreicht, da fälschlicherweise vervielfachte Sequenzen aus der ersten Runde nun nicht vom Primer gebunden werden.

In dieser Arbeit wurde eine Abwandlung der *nested*-Technik verwendet, bei der zwar ebenfalls das PCR Produkt einer Amplifikationsrunde als *template* für eine weitere

Runde verwendet wurde, bei der jedoch in beiden Runden dasselbe Primerpaar eingesetzt wurde. Dadurch wurde eine höhere Sensitivität erreicht, wobei die Spezifität durch die nachfolgende Sequenzierung gewährleistet wurde.

Für die PCR Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

Reagenz	Menge	Endkonzentration
cDNA	1 µl	200 µM
dNTP	1 µl	200 µM
Polymerase	0,25 µl	2U/l
Primer sense	0,5 µl	0,5 µM
Primer antisense	0,5 µl	0,5 µM
PCR-Puffer 10x	5 µl	
H ₂ O	41,75 µl	

	Runde	Zyklus	Denaturierung		Anlagerung		Elongation	
Aktivierung Polymerase			94 °C	120 s	-	-	-	-
Nested-PCR	1. Runde	1 - 15	94 °C	30 s	56 °C	30 s	72 °C	30 s
	2. Runde	16 - 50	94 °C	30 s	56 °C	30 s	72 °C	30 s

2.3.1.4 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 3,0 g Agarose mit 200 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach Zugabe von 7,5 µl Ethidiumbromid, wurde es in die vorgegebene Gelwanne gegossen und 1 h lang bei RT abgekühlt. Nach Einbringen in die Elektrophorese-Kammer wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet und die DNA-Proben mit 5-fachen Ladepuffer in die Geltaschen geladen. Nun erfolgte das Anlegen eines elektrischen Feldes, welches durch Einstellen der Stromstärke auf 90 bis 100 mA und Wahl eines nicht begrenzenden Spannungswertes festgelegt wurde. Da der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in die Nukleotidstränge interkaliert, konnte die Auftrennung der DNA-Fragmente im UV-Licht (366 nm) kontrolliert und mit Hilfe einer Polaroidsofortbildkamera festgehalten werden.

2.3.1.5 Klonierung

Unter Klonierung versteht man die Einführung eines DNA-Fragments in einen Vektor, der die massenhafte Vermehrung dieser DNA ermöglicht. In unserem Falle wurde die Klonierung zur selektiven Vermehrung der einzelnen IFN- α -Subtypen verwendet.

Dazu wurde das PCR-Produkt der Amplifikation aller IFN- α -Subtypen in einen pGEM-T-Vektor (Fa. Promega, Mannheim) eingebracht. Dieser Vektor liegt bereits in geschnittener Form vor; außerdem wurde an beiden Enden in 3'-Position ein Thymidin angehängt. Dadurch wird zum einen ein erneutes Schließen des Vektors verhindert, zum anderen wird die Insertion solcher PCR-Produkte erleichtert, deren Polymerase *template*-unabhängig ein Deoxyadenosin an das 3'-Ende anfügt. Der Reaktionsansatz der Ligation setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen: 5 μ l 2x Rapid Ligation Buffer, 1 μ l (50 ng) pGEM-T-Vektor, 2 μ l PCR-Produkt, 1 μ l (3 Weiss units) T4 Ligase, 1 μ l destilliertes Wasser. Die Ligation lief während einer Stunde bei RT ab.

Die Transformation, also das Einschleusen des Plasmids mit dem integrierten PCR-Produkt in einen Bakterienstamm zum Zwecke seiner Vermehrung, wurde in den Bakterienstamm JM 109 (Fa. Promega, Mannheim) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt 2 μ l Ligationsprodukt sowie 50 μ l JM 109-Zellen. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock von 45 bis 50 s bei 42°C ausgesetzt und wieder auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die nun transformierten Zellen in Soc Medium aufgenommen und für 90 min bei 37°C geschüttelt. Je 100 μ l dieser Ansätze wurden dann auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden pro Bedingung je 50 Stück zufällig ausgewählt und in Kolben mit LB-Medium auf dem Schüttler über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.3.1.6 DNA-Isolation

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kits. Dazu wurden 3 - 4ml der Bakterienkultur in Lösung I/RNase aufgenommen und durch Zugabe von Lösung II lysiert. Nach Neutralisierung des Lysats wurde die Probe auf die HiBind[®] Miniprep-Zentrifugensäule geladen. Das Funktionsprinzip dieser Säule besteht darin, dass die enthaltene Silikamembran Plasmid-DNA bindet, während die restlichen Zellbestandteile passieren können und durch mehrere Waschschriffe möglichst vollständig entfernt werden. Nach dem Trocknen der Säule kann die Plasmid-DNA mit sterilem Wasser eluiert und bei -20°C aufbewahrt werden.

2.3.1.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung stellt eine molekularbiologische Methode zur Bestimmung der Basenabfolge einer DNA-Sequenz dar. Sie erfolgt nach folgendem Prinzip: Die zu bestimmende DNA-Sequenz wird mit Hilfe von standardisierten Primern und einer Polymerase vervielfacht, wobei für jede Sequenzierung vier verschiedene Ansätze existieren. Als Bindungsstelle für die Primer dienen dabei Basenfolgen an den Enden der DNA-Fragmente, die sequenziert werden sollen. Zu jedem dieser Ansätze werden nun sowohl normale Deoxynukleotide als auch je ein Nukleotid in Dideoxy-Form (also Dideoxy-Adenosin, -Cytosin, -Guanin oder -Thymin) in einem bestimmten Verhältnis gegeben. Sobald die Polymerase nun ein Dideoxy-Nukleotid einbaut, führt dies zum Kettenabbruch, da keine weitere Bindungsstelle mehr vorhanden ist. Durch ein geeignetes Verhältnis an Deoxy- und Dideoxy-Nukleotiden wird erreicht, dass an jeder Nukleotidposition der Sequenz Dideoxy-Nukleotide zum Kettenabbruch führen und somit DNA-Fragmente charakteristischer Länge entstehen. Werden nun die DNA-Fragmente der vier Ansätze nebeneinander durch Gel-Elektrophorese aufgetrennt, lässt sich über die Abfolge der Fragmentlängen und die Kenntnis des zum Abbruch führenden Nukleotids die Basenabfolge der Sequenz ablesen. Dabei ist die Länge der qualitativ hochwertig sequenzierbaren DNA begrenzt, da ab einer gewissen Größe eine Kettenverlängerung vor Abbruch durch den Einbau von Dideoxy-Oligonukleotiden immer unwahrscheinlicher wird und schließlich nicht mehr vorkommt.

In dieser Arbeit wurde nach alkalischer Denaturierung der DNA in 1 µl 1 M NaOH (10 min bei RT inkubieren), 8 µl NH₄-Acetat 10 M und 100 µl eisgekühltem 100 % EtOH für zwei Stunden bei -70 °C oder über Nacht bei -20 °C die Sequenzierung nach dem Protokoll des DNA Sequencing Kit (usb) durchgeführt. Dabei wurden nur einige Proben zur Kontrolle der vorangegangenen Arbeitsschritte zur Bestimmung der IFN- α -Subtypen-Expression auf diese Weise sequenziert; die restlichen Sequenzierungen wurden von der Firma MWG Biotech AG (Martinsried, D) durchgeführt.

2.3.2 Western Blot

Die Methode des Western *blotting* bezeichnet den elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran, die dann durch unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden können.

Vor dem eigentlichen Blot wird ein Proteingemisch mit Hilfe der Gel-Elektrophorese in einer Trägermatrix (meist Polyacrylamid-Gel) entsprechend ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Beim Bloten werden die Proteine durch ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran transferiert, auf deren

Oberfläche sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Die Visualisierung der gesuchten Proteine erfolgt meist durch Immunodetektion, wobei ein antigenspezifischer Primärantikörper an Epitope des Proteins bindet. An den primären Antikörper bindet wiederum ein sekundärer Antikörper, über welchen die Detektion erfolgt. Diese wird z.B. durch ein an den Sekundärantikörper gebundenes Enzym wie *horse radish peroxidase* (HRP) ermöglicht, dass eine zugegebene Substanz zur Lumineszenz anregt. Durch diese Chemilumineszenz wird ein photographischer Film geschwärzt. Vor Zugabe der Antikörper wird die Membran geblockt, das heißt die freien Stellen werden mit Proteinen (Milchpulver, BSA) besetzt, um ein unspezifisches Haften der Antikörper zu vermeiden.

Die Zellen wurden in 15 bis 20 µl 4x Laemmli-Puffer lysiert und für 2 min auf 95°C erhitzt. Zur Zerstörung der enthaltenen Nukleinsäuren wurden die Lysate sonifiziert, nochmals erhitzt und nach Abzentrifugieren des Zellschrotts bei -80°C aufbewahrt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 10% Polyacrylamid-Gel bei 60 mA. Danach folgte die Übertragung auf die Nitrozellulose-Membran bei 4°C, 450 mA für 90 min. Nach der Übertragung wurde die Membran mit Ponceau-Rot, einer unspezifischen Proteindarstellung gefärbt, um zu kontrollieren, ob sich annähernd gleich viel Protein in jeder Spur befand. Zum Blocken wurde die Membran 60 min in 5% Milch in TBS geschüttelt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:1000 mit 1 % Milch in TBS über Nacht bei 4°C. Nach mehreren Waschschritten mit TBS-0,1% Tween wurde der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in 1 % Milch in TBS für 90 min bei RT zur Membran gegeben. Nach weiteren Waschschrritten wurden die detektierten Proteine mit Hilfe des Chemilumineszenz-Signals auf einem Film sichtbar gemacht. Zur Darstellung anderer auf der Membran fixierter Proteine, können die Antikörper wieder entfernt werden. Dazu wird die Membran 30 min bei 50 bis 60°C in Strip-Lösung inkubiert und mit TBS-Tween gewaschen. Danach kann das beschriebene Protokoll ab dem Schritt des Blockens erneut durchgeführt werden.

3. ERGEBNISSE

3.1 Teil I: Charakterisierung der unterschiedlichen Wirkungen von CpG-A und CpG-B Oligodeoxynukleotiden auf die humane plasmazytoide dendritische Zelle

3.1.1 Die CpG-A- und die CpG-B-induzierte Interferon- α -Produktion in der plasmazytoiden dendritischen Zelle zeigt einen unterschiedlichen zeitlichen Verlauf

Die IFN- α -Induktion durch CpG-A und CpG-B in der PDC unterscheidet sich nicht nur quantitativ, sondern auch hinsichtlich ihrer Kinetik: Während die PDC auch nach 24 h Stimulation mit CpG-A noch IFN- α produziert, lässt sich bereits 12 h nach Stimulation mit CpG-B kein neu produziertes IFN- α mehr nachweisen (Kerkmann, Rothenfusser et al. 2003). Im folgenden wurde die Kinetik der IFN- α -Produktion näher untersucht und der Kinetik der Produktion von IL-8 und der Expression kostimulatorischer Moleküle gegenübergestellt. Dazu wurden aufgereinigte PDC mit CpG-A oder CpG-B inkubiert; nach den angegebenen Zeitintervallen (1 h, 3 h, 5 h, 7 h, 9 h, 11 h, 13 h, 15 h, 22 h, 48 h) wurden die Überstände mittels ELISA auf IFN- α und IL-8 untersucht. Parallel dazu wurde flowzytometrisch die Expression von CD80 und CD86 bestimmt.

Dabei zeigte sich, dass CpG-A nach 48 h Inkubationszeit weitaus größere Mengen an IFN- α induzierte als CpG-B (je nach Spender das 20- bis 40-fache) (s. Abb. 7A). Während der ersten sieben Stunden bewegte sich die IFN- α -Produktion durch beide CpG-Klassen auf einem ähnlichen Niveau, wobei sich CpG-B hier in manchen Spendern sogar noch als leicht überlegen erwies. Nach ca. 10h erreichte die CpG-B induzierte IFN- α -Produktion jedoch ein Plateau, wohingegen die IFN- α -Produktion in CpG-A-stimulierten PDC mindestens 48 h lang anhielt. Abb. 7B zeigt die IFN- α -Werte als prozentuale Anteile des 48 h-Werts; hier werden die frühe Plateauphase nach 11 – 13 h CpG-B-Stimulation im Gegensatz zur lang anhaltenden, protrahierten IFN- α -Produktion nach Stimulation mit CpG-A besonders deutlich. Im Gegensatz zu IFN- α übertraf die CpG-B-induzierte IL-8-Produktion CpG-A-induziertes IL-8 um in etwa das Siebenfache (s. Abb. 8A). Für die Expression kostimulatorischer Moleküle (s. Abb. 8C, D) und, schwächer ausgeprägt, auch für die IL-8-Produktion ließ sich ein verzögerter Beginn der CpG-A-induzierten Effekte erkennen, wie es auch für die IFN- α -Produktion beobachtet wurde. Sowohl die IL-8-Produktion als auch die Expression von CD80 und CD86 stiegen dann jedoch für CpG-A und CpG-B über 48h hin kontinuierlich an, wenn auch auf einem höheren Level für CpG-B. Eine Plateauphase wurde im Beobachtungszeitraum für keinen der beschriebenen Parameter erreicht (s. Abb. 8).

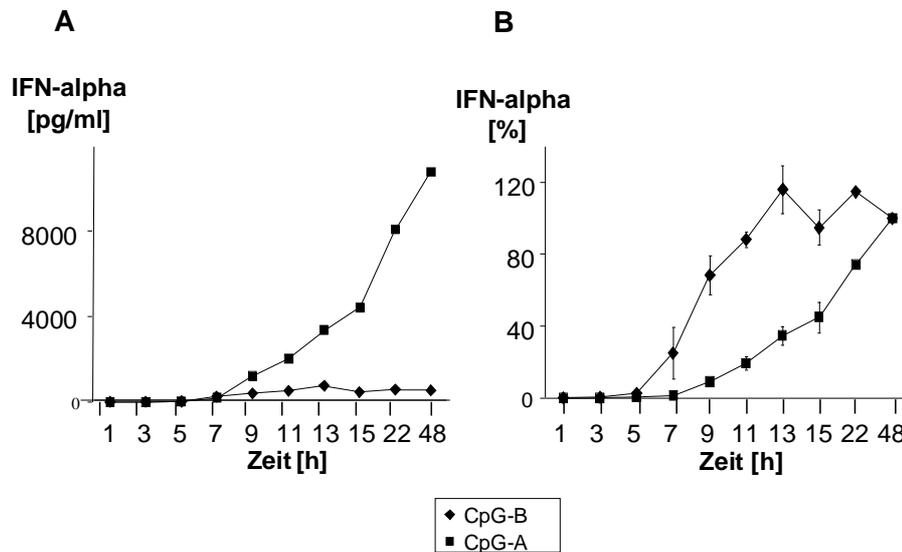


Abb. 7 CpG-A- und CpG-B-induzierte IFN- α -Produktion haben einen unterschiedlichen zeitlichen Verlauf

Aufgereinigte PDC (50.000 Zellen/Bedingung) wurden mit CpG-A (ODN 2216) oder CpG-B (ODN 2006) inkubiert (je 3 μ g/ml); zu den angegebenen Zeiten wurden die Überstände abgenommen und IFN- α im ELISA bestimmt. Abb. 1A zeigt einen repräsentativen Spender von drei; in Abb. 1B sind die Werte als prozentuale Anteile des jeweiligen 48h Wertes aufgetragen, der als 100 % festgelegt wurde. Es handelt sich um die Mittelwerte von drei Spendern \pm SEM.

3.1.2 Während CpG-A und CpG-B ein ähnliches Spektrum an frühen Interferon- α -Subtypen induzieren, führt nur die Stimulation mit CpG-A zu einer späten Interferon- α -Produktion mit einem distinkten Muster an Interferon- α -Subtypen

Nach der Charakterisierung der Kinetiken der IFN- α -Induktion durch CpG-A und CpG-B erfolgte die Analyse des Expressionsmusters der IFN- α -Subtypen nach Stimulation von PDC mit CpG-A und CpG-B. Die hierbei betrachteten Zeitpunkte wurden in der Absicht ausgewählt, sowohl das Expressionsmuster der frühen Phase der IFN- α -Produktion (5h) als auch der späten Phase eines evtl. positiven autokrinen *feedback loops* (24h) beurteilen zu können. Dazu wurden aufgereinigte PDC von drei Spendern mit CpG-A oder CpG-B stimuliert, 5 h bzw. 24 h inkubiert und nach Stimulation gepoolt, um eine ausreichende Zellmenge sicher zu stellen. Nach Lyse der Zellen wurde die RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Mittels Konsensus-Primer, die an konservierte Sequenzen aller IFN- α -Subtypen binden, wurde durch PCR das gesamte IFN- α für die verschiedenen Bedingungen amplifiziert. Die so erhaltene Mischung an cDNAs wurde

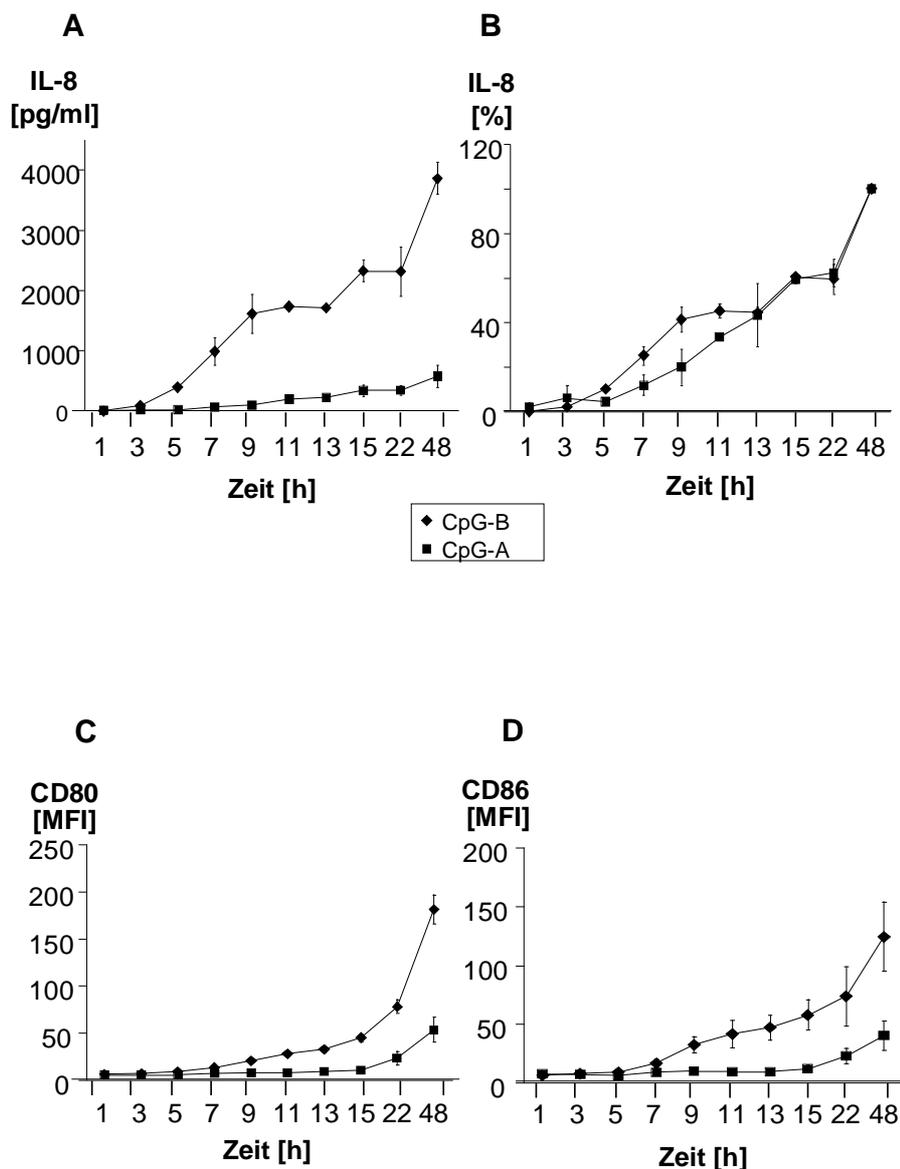


Abb. 8 IL-8-Produktion und Regulation kostimulatorischer Moleküle laufen in der PDC nach Stimulation mit CpG-A und CpG-B mit ähnlichen Kinetiken ab

Aus den Überständen des oben beschriebenen Versuches (s. Abb. 7) wurde im ELISA IL-8 gemessen; Abb. 8A zeigt die Mittelwerte \pm SEM für die drei Spender, in Abb. 8B sind diese wieder als prozentuale Anteile der jeweiligen 48h-Werte dargestellt. Außerdem wurde zu den angegebenen Zeitpunkten die Expression von CD80 und CD86 in einer 4-Farben FACS-Analyse bestimmt. In Abb. 2C und 2D sind die Mittelwerte aus drei Spendern \pm SEM aufgetragen.

in einen pGEM-T Vektor ligiert und kloniert. Unter der Prämisse, dass jeder Bakterienklon nur einen IFN- α -Subtyp exprimiert, wurden für jede Bedingung 50 Klone zufällig ausgewählt und der jeweils exprimierte Subtyp durch Sequenzierung bestimmt. Das PCR-Produkt wurde nach Amplifikation aller Subtypen mit Hilfe des Konsensus-Primers auf einem Agarose-Gel analysiert. Dabei bestätigten sich auf RNA-Ebene die

zuvor auf Proteinebene erhobenen Befunde: Nach 5h Stimulation induzierten sowohl CpG-A als auch CpG-B deutliche Mengen an IFN- α -RNA. Nach 24h Stimulation mit CpG-B war jedoch keine IFN- α -RNA mehr zu detektieren, während die Transkription nach Stimulation mit CpG-A über 24h hinaus anhielt (s. Abb. 9).

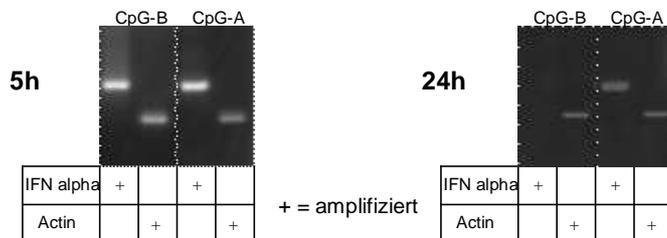


Abb.9 Nur bei Stimulation mit CpG-A ist nach 24 h noch eine Transkription von IFN- α -RNA nachweisbar

Aufgereinigte PDC von drei Spendern wurden für 5h bzw. 24h mit 3 μ g/ml ODN 2216 (CpG-A) oder ODN 2006 (CpG-B) stimuliert und danach gepoolt. Nach Extraktion der zytoplasmatischen RNA wurde diese durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Für jede Bedingung wurden mit Hilfe eines IFN- α Konsensus-Primers alle IFN- α -Subtypen sowie Aktin als Positivkontrolle in einer Nested PCR amplifiziert (s. Material und Methoden). Das PCR Produkt wurde auf einem Agarosegel aufgetragen.

Nach 5h wurden durch CpG-A und CpG-B bereits eine Vielzahl an IFN- α -Subtypen exprimiert. Dabei ergab sich für beide CpG-Klassen ein sehr ähnliches Verteilungsmuster: Der Schwerpunkt der Produktion lag auf IFN- α 2 (33 % für CpG-B, 24 % für CpG-A), IFN- α 14 (20 % für CpG-B und CpG-A), IFN- α 1 (15 % für CpG-B und CpG-A) und IFN- α 10 (15 % für CpG-B, 4 % für CpG-A). Auch IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 6, IFN- α 7, IFN- α 8 und IFN- α 17 wurden in geringeren Mengen exprimiert wurden (s. Abb. 10; schwarze Balken). Nach 24h änderte sich das Expressionsmuster der Subtypen für CpG-A (CpG-B induzierte zu diesem Zeitpunkt keine IFN- α -Transkription mehr): IFN- α 1 stellte nun mit 40% aller Subtypen den am stärksten transkribierten Vertreter dar, wobei nur mehr kleinere Mengen an IFN- α 2, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 7, IFN- α 10, IFN- α 14, IFN- α 16, IFN- α 17 und IFN- α 21 zu detektieren waren (schraffierte Balken). In Abb. 10 sind jeweils die frühen und die späten Zeitwerte für eine CpG-Klasse in einem Diagramm gegenübergestellt, um einen besseren Vergleich des veränderten Subtypenmusters für CpG-A nach 24h zu ermöglichen.

Während CpG-A und CpG-B also während der frühen Phase der IFN- α -Produktion ein ähnliches Muster an IFN- α -Subtypen induzieren, existiert eine qualitativ unterschiedliche späte Phase der IFN- α -Produktion mit einem deutlichen *shift* zu IFN- α 1, die nur durch CpG-A induziert werden kann.

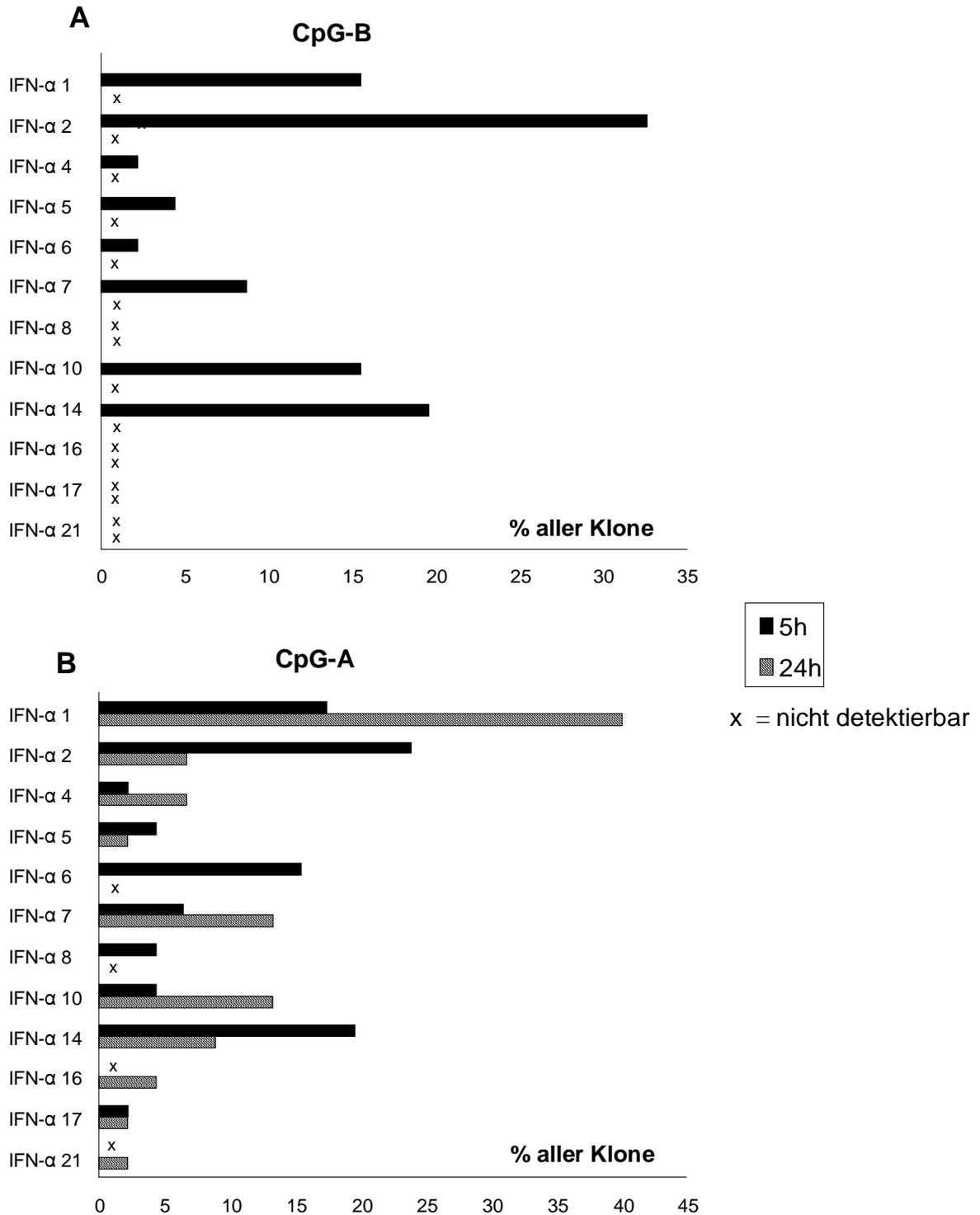


Abb.10 CpG-A induziert ein spätes IFN- α -Subtypenmuster, das sich von dem frühen durch CpG-A und CpG-B induzierten Subtypenmuster unterscheidet

Die amplifizierte IFN- α -cDNA (s. Abb. 9) wurde in einen pGEM-T Vektor ligiert und in einem E.coli Stamm kloniert. Für jede Bedingung wurden 50 Klone ausgewählt, deren DNA extrahiert wurde. Durch Sequenzierung wurde der jeweils exprimierte IFN- α -Subtyp bestimmt. Gezeigt sind die prozentualen Anteile der einzelnen Subtypen pro 50 Sequenzierungen für Stimulation mit CpG-B (A) und CpG-A (B), wobei die schwarzen Balken die 5h-Werte und die schraffierten Balken die 24h-Werte darstellen.

3.2 Teil II: Analyse von Unterschieden in den Signaltransduktionswegen ausgelöst durch CpG-A und CpG-B Desoxynukleotide

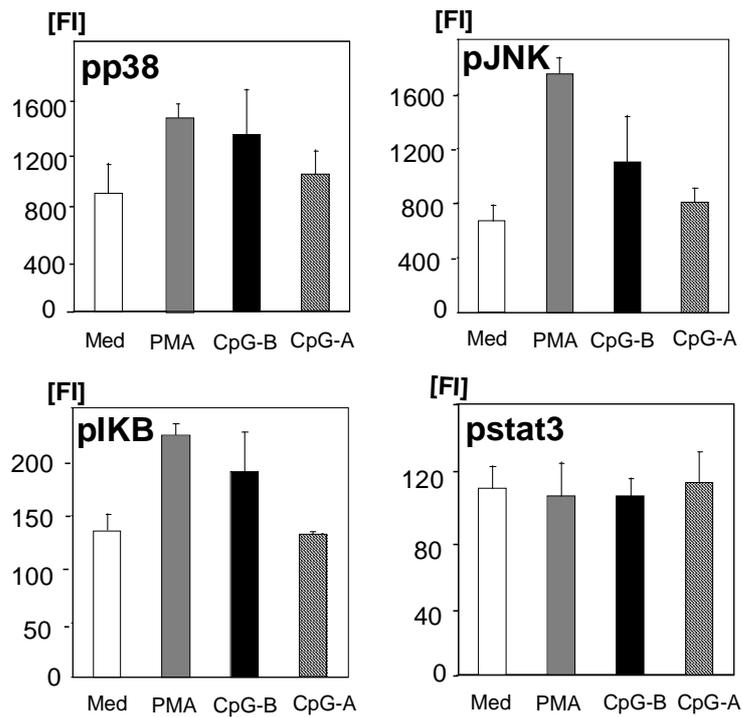
3.2.1 Aktivierung von p38, JNK, I κ B und Stat3 durch CpG-A und CpG-B in der B-Zelle

Nachdem eine Aktivierung von p38, JNK und NF- κ B durch CpG-B in B-Zellen bereits gezeigt wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob sich als molekulares Korrelat der fehlenden Induktion von Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen durch CpG-A in der B-Zelle eine fehlende Aktivierung dieser Signaltransduktionsmoleküle nachweisen lässt. Als Methode zur vergleichenden Darstellung der Aktivierung der MAP-Kinasen und NF- κ B durch CpG-A und CpG-B wurde der Bioplex Phosphoprotein-assay gewählt, der die Bestimmung des Phosphorylierungszustandes ausgewählter Signaltransduktionsmoleküle ermöglicht. Aufgereinigte B-Zellen wurden für 30 min bzw. 45 min mit Medium, PMA als Positivkontrolle, CpG-A und CpG-B inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proben gemäß des angegebenen Protokolls für den Bioplex Phosphoprotein-assay zuerst mit den an fluoreszierende *beads* gekoppelten Antikörpern inkubiert, welche die simultane Messung verschiedener Parameter in einem *well* ermöglichen. Nach mehreren Zwischenschritten folgte die Inkubation mit den *detection antibodies* und deren Fluoreszenzmarkierung, die der Quantifizierung der gebundenen phosphorylierten Signaltransduktionsmoleküle dienen. (siehe Material und Methoden)

Auf diese Weise konnte die Phosphorylierung von p38, JNK, I κ B- α und Stat3 bestimmt werden: Bereits nach 30 min wurde deutlich, dass CpG-B die Aktivierung von p38, JNK und I κ B- α induzierte, während keine verstärkte Phosphorylierung dieser Signaltransduktionsmoleküle durch CpG-A zu detektieren war (s. Abb. 11). Nach 45min Inkubationszeit war die Aktivierung von p38, JNK und I κ B- α noch deutlicher zu erkennen, wobei sich CpG-B hier, wie auch zum frühen Zeitpunkt, für die p38-Aktivierung sogar als der Positivkontrolle PMA gleichwertig erwies. Auch zu diesem späteren Zeitpunkt unterschied sich die durch CpG-A induzierte Phosphorylierung von p38, JNK und I κ B- α nicht vom Mediumwert. Bezüglich des Phosphorylierungsgrades von stat3 ließen sich mit der Bioplex-Methode keine relevanten Unterschiede zwischen Mediumkontrolle und Stimulation mit PMA, CpG-A oder CpG-B erkennen. Da es sich hier aber nicht um absolut zu sehende Werte handelt, sondern um im Vergleich zu gesicherten Kontrollen zu interpretierende relative Fluoreszenzintensitäten, ist eine Unterscheidung zwischen einer bereits unter Kontrollbedingungen bestehenden konstitutiven Phosphorylierung von stat3, welche durch die verwendeten Stimuli nicht

beeinflusst wird, und einer fehlenden Aktivierung für alle Bedingungen nicht möglich. In Einklang mit der fehlenden Induktion von Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen durch CpG-A in der B-Zelle findet also keine Aktivierung von p38, JNK und I κ B- α durch CpG-A statt, während Stimulation mit CpG-B zur Phosphorylierung dieser Signaltransduktionsmoleküle führte.

A 30min



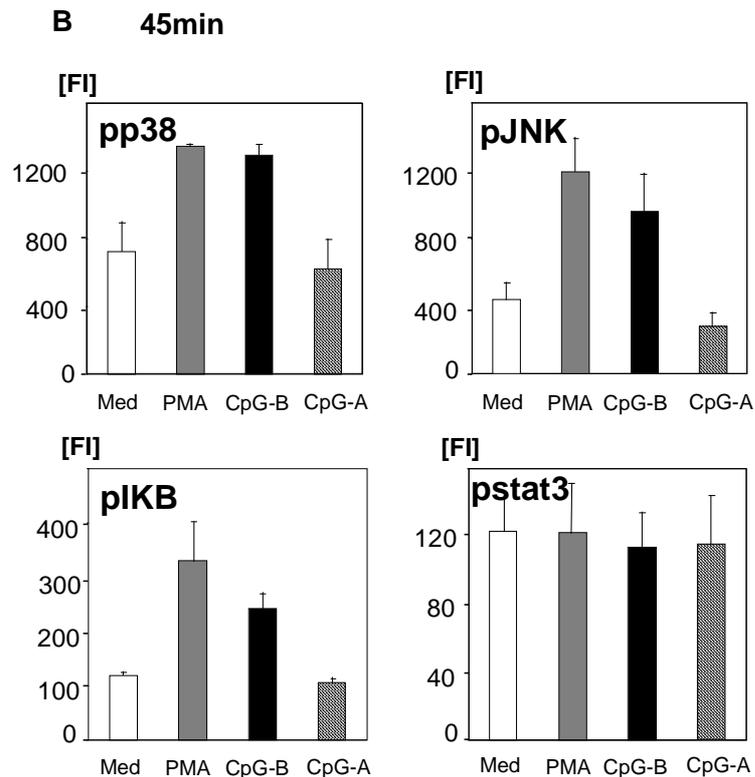


Abb.11 Stimulation mit CpG-A führt nicht zur Aktivierung von p38, JNK und I κ B in der B-Zelle

Aufgereinigte B-Zellen (1,5 Mio Zellen/Bedingung) wurden für 30 min (A) bzw. 45 min (B) mit Medium, PMA (40 nM), ODN 2006 (3 μ g/ml) oder ODN 2216 (3 μ g/ml) inkubiert. Die Lysate wurden in Biorad *microtiter plates* über Nacht mit den an fluoreszierende *beads* gekoppelten Antikörpern gegen phosphoryliertes p38, JNK, I κ B α und stat3 inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte über 30min die Inkubation mit den entsprechenden *detection antibodies* und nach weiteren Waschschritten deren Fluoreszenzmarkierung (10min bei RT). Die Daten wurden an einem Biorad Bioplex Reader erhoben und mit Hilfe der entsprechenden Software analysiert (s. Material und Methoden).

3.2.2 Analyse der Aktivierung von p38, ERK und Stat1 durch CpG-A und CpG-B in der plasmazytoiden dendritischen Zelle

3.2.2.1 p38 und ERK werden durch CpG-A und CpG-B in der plasmazytoiden dendritischen Zelle aktiviert, jedoch mit unterschiedlichem zeitlichen Verlauf

Neben der geschilderten Untersuchung der B-Zellen lag ein besonderes Augenmerk auf der Aktivierung der MAP-Kinasen durch CpG-A und CpG-B in der PDC. Da sich sowohl die gängigere Methode der Darstellung der Phosphorylierung im Western Blot als auch der für die B-Zellen verwendete Bioplex Phosphoprotein-assay aufgrund der niedrigen verfügbaren Zellzahlen an PDC als ungeeignet herausstellten, wählten wir

eine 2001 publizierte Methode, die es erlaubt, die Phosphorylierung von Signaltransduktionsmolekülen durchflusszytometrisch zu bestimmen (Chow, Patel et al. 2001). Für die Analyse der Phosphorylierung von p38 wurden aufgereinigte PDC für 30 min, 90 min und 4 h mit CpG-A und CpG-B inkubiert. Nach den angegebenen Zeitintervallen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem PE-markierten monoklonalen Antikörper gegen phosphoryliertes p38 intrazellulär gefärbt. Die Daten wurden in einer 4-Farben FACS-Analyse ermittelt; dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil an Zellen, die für phosphoryliertes p38 positiv sind.

Für die Aktivierung von p38 ergab sich dabei folgendes Bild: Stimulation mit CpG-B führte nach 30 min zu einem leichten (50% positive Zellen), nach 90 min und 4 h zu einem deutlichen Anstieg (80% positive Zellen) der p38-Phosphorylierung gegenüber 30% positiven Zellen in der Mediumkontrolle. Für CpG-A ließ sich nach 30 min und 90 min noch keine p38-Aktivierung detektieren; hier begann die Phosphorylierung zwischen 90 min und 4 h Stimulation, um dann nach 4h Werte um 50% positive (Medium: 30% positive) zu erreichen. (s. Abb. 12)

Für die Darstellung von phosphoryliertem ERK wurden aufgereinigte PDC 30 bzw. 90 min mit Medium, PMA, CpG-A oder CpG-B inkubiert. Nach Fixation und Permeabilisierung wurde pERK mit Hilfe eines spezifischen polyklonalen Antikörpers und eines fluoreszierenden Sekundärantikörpers (Alexa Fluor) gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Hier ließ sich ein ähnliches Verteilungsmuster wie für die Phosphorylierung von p38 erkennen: CpG-B erwies sich nach 30 min und 45 min Stimulation als starker Stimulus (35% bzw. 45% positive Zellen im Vergleich zu 5% positiven Zellen in der Mediumkontrolle), der in seiner Fähigkeit ERK zu aktivieren sogar PMA überlegen war (35% bzw. 25 % positive Zellen). Im Gegensatz hierzu befand sich die ERK-Aktivierung durch CpG-A nach 30min noch auf dem Level der Mediumkontrolle (5% positive Zellen). (s. Abb. 13)

Erst nach 45min konnte man von einem beginnenden Anstieg über Mediumwerte ausgehen (10% positive Zellen). Es ließ sich also sowohl für CpG-A als auch für CpG-B eine Aktivierung von ERK und p38 in der PDC nachweisen, wobei die CpG-A vermittelten Effekte für beide Signalwege verzögert einsetzen.

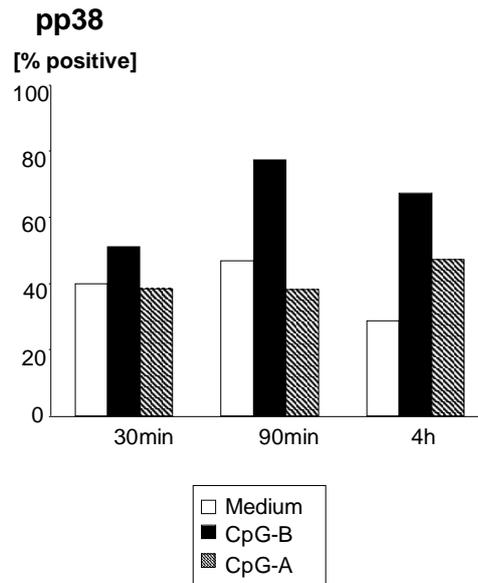


Abb.12 p38 wird in der PDC durch CpG-B schneller aktiviert als durch CpG-A
Aufgereinigte PDC (50.000 Zellen/Bedingung) wurden für 30 min, 90 min oder 4 h mit 3 µg/ml ODN 2006 oder ODN 2216 inkubiert, mit 10% Formaldehyd fixiert und in 90% Methanol permeabilisiert. Danach wurde für 60 min mit einem monoklonalen Antikörpers gegen phosphoryliertes p38 gefärbt. Die Phosphorylierung von p38 wurde in einer 4-Farben FACS-Analyse bestimmt (s Material und Methoden). Gezeigt ist der Prozentsatz der phospho-p38 positiven Zellen eines repräsentativen Spenders.

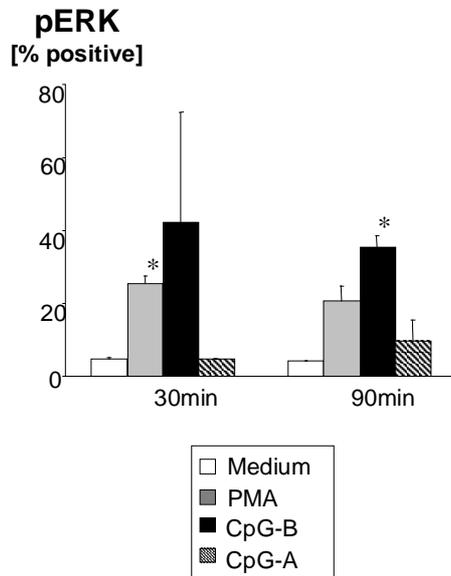


Abb.13 Stimulation mit CpG-B führt zu einer frühen Aktivierung von ERK in der PDC
Aufgereinigte PDC (50.000 Zellen/Bedingung) wurden mit Medium, PMA (20 nM), ODN 2006 (3 µg/ml) oder ODN 2216 (3 µg/ml) inkubiert und nach 30 bzw. 90 min in Formaldehyd fixiert und in Methanol permeabilisiert. Nach mehreren Waschschritten folgte die Inkubation mit einem polyklonalen phosphoERK-Antikörper (30 min) und dessen Markierung mit einem fluoreszierenden Alexa Fluor-Sekundärantikörper (15 min). Die Messung erfolgte als 4-Farben FACS-Analyse. Dargestellt sind die Anteile der pERK-positiven Zellen [Mittelwerte zweier Spender ± SEM]. (* = $p < 0,05$ gegenüber der Mediumkontrolle)

3.2.2.2 CpG-A und CpG-B induzieren Stat1-Phosphorylierung in der plasmazytoiden dendritischen Zelle

Im folgenden wurde die Aktivierung von Stat1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation mit CpG-A und CpG-B untersucht. Dazu wurden isolierte PDC für 90 min bzw. 8h mit CpG-A und CpG-B inkubiert und lysiert; nach Auftrennung der Proteine auf einem Polyacrylamid-Gel wurden mittels Western Blot Gesamt-Stat1 sowie Serin- und Tyrosin-phosphoryliertes Stat1 bestimmt.

Dabei ließen sich nach 90min Stimulation für alle Bedingungen annähernd gleich große Mengen an Gesamt-Stat1 nachweisen (s. Abb.14). Während Stat1 unter Mediumbedingungen auch nach 8h nicht verstärkt exprimiert wurde, hatte nach 8h Stimulation mit CpG eine erhebliche Verstärkung der Stat1-Translation stattgefunden,

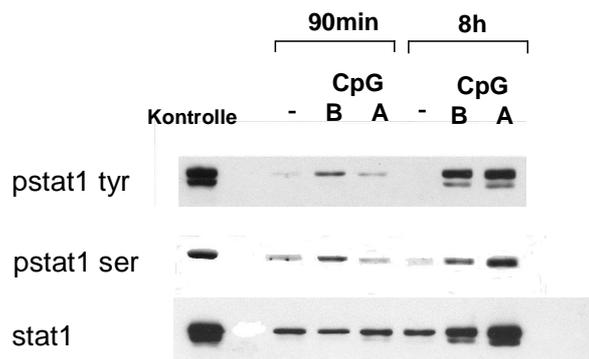


Abb.14 CpG-A und CpG-B aktivieren Stat1 in der PDC, wobei die CPG-A-induzierte Aktivierung einen langsameren zeitlichen Verlauf aufweist

Aufgereinigte PDC (300.000 Zellen/Bedingung) wurden für 90 min bzw. 8 h mit Medium, CpG-A oder CpG-B inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine auf einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran überführt. Die Membran wurde 60 min in 5% Milch geblockt; es folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (1:1000 in 1% Milch) über Nacht und daraufhin die Inkubation mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:2500 in 1% Milch) für 90 min. Die Chemilumineszenz-Signale wurden auf einem Film detektiert. Für die Anfärbung mit verschiedenen Antikörpern wurde der Blot mehrmals gerstriipt (s. Material und Methoden). Gezeigt ist ein repräsentativer Spender aus dreien.

welche nach Stimulation mit CpG-A ausgeprägter war als nach Stimulation mit CpG-B. Nach 90 min war unter Mediumbedingungen eine leichte Phosphorylierung an Serin und Tyrosin zu erkennen, die nach 8h für beide Phosphorylierungsorte fast vollkommen verschwunden war. Für CpG-B fand nach 90min bereits eine die Mediumkontrolle klar übertreffende Serin- und Tyrosin-Phosphorylierung statt; nach 8h Stimulation mit CpG-B war nur die Tyrosin-Phosphorylierung stark angestiegen, während die Serinbanden für beide Zeitwerte vergleichbar erschienen. Unter Stimulation mit CpG-A unterschied sich die Stat-Phosphorylierung (Serin und Tyrosin) nach 90min nicht wesentlich von der Mediumkontrolle. Nach 8h jedoch war es zu einem starken Anstieg von Serin- und Tyrosin-Phosphorylierung gekommen, die nun sogar die CpG-B-induzierte Phosphorylierung zu diesem Zeitpunkt übertrafen. Stat1-Aktivierung wird also in der frühen und der späten Phase der IFN- α -Produktion durch CpG-B induziert, während nach Stimulation mit CpG-A eine verzögerte, dafür aber stärkere Aktivierung zum späten Zeitpunkt zu erkennen ist.

3.2.3 Analyse der funktionellen Bedeutung von MAP-Kinasen und NF- κ B auf die CpG-A- und CpG-B-induzierte Aktivierung und Zytokinproduktion in der plasmazytoiden dendritischen Zelle

3.2.3.1 Durch Inhibition von p38 wird die CpG-A- und die CpG-B-induzierte IFN- α -Produktion gehemmt

Nach dem Nachweis einer CpG-induzierten Aktivierung der MAP-Kinasen wurden die funktionellen Auswirkungen einer p38-Hemmung auf die Induktion von IFN- α , IL-8 und kostimulatorischen Molekülen durch CpG-A und CpG-B untersucht. Dazu wurden aufgereinigte PDC zuerst für 30 min mit dem spezifischen p38-Inhibitor SB230580 vorinkubiert und dann in Anwesenheit des Inhibitors für 48h mit CpG-A oder CpG-B stimuliert. Wir wählten dazu eine Inhibitorkonzentration, die in der Konzentrationsreihe eine deutlich hemmende Wirkung zeigte, ohne das Überleben der Zellen zu beeinträchtigen (durchflusszytometrische Analyse; Daten nicht gezeigt). Aus den Überständen wurden mittels ELISA IFN- α und IL-8 bestimmt, CD80 und CD86 wurden in der FACS-Analyse dargestellt.

Es zeigte sich eine signifikante Hemmung sowohl der CpG-A- als auch der CpG-B-induzierten IFN- α -Produktion (s. Abb. 15A). In Abb. 15B sind die unter p38-Inhibition verbleibenden IFN- α -Mengen als prozentuale Anteile des Ausgangswertes ohne Inhibition dargestellt, um die beiden CpG-Klassen trotz unterschiedlicher Absolutwerte

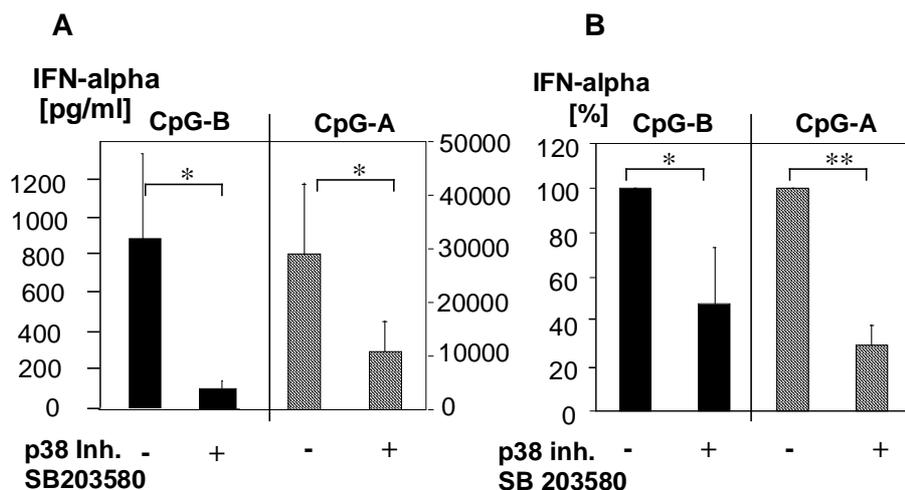


Abb.15 Die CpG-A- und die CpG-B-induzierte IFN- α -Produktion in der PDC wird durch Inhibition von p38 signifikant gehemmt

Aufgereinigte PDC (50.000 Zellen/Bedingung) wurden 48 h lang mit 6 μ M SB203580 (einem spezifischen p38-Inhibitor) und 3 μ g/ml ODN 2006 bzw. ODN 2216 inkubiert, wobei der Inhibitor 30 min vor Stimulation mit den CpG-ODN zu den Zellen gegeben worden war. IFN- α wurde im ELISA bestimmt. In A sind die Mittelwerte \pm SEM aus vier verschiedenen Spendern dargestellt (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$); B zeigt den prozentualen Anteil des nach Hemmung verbleibenden IFN- α in Bezug auf den nicht inhibierten Kontrollwert.

besser vergleichen zu können. Durch p38-Inhibition wird die CpG-B-induzierte IFN- α -Produktion um 52% von 874 pg/ μ l auf 111 pg/ μ l verringert; eine geringfügig stärkere Hemmung um 71% von 29011 pg/ μ l auf 10844 pg/ μ l ließ sich für CpG-A-induziertes IFN- α beobachten. Ähnliche Erkenntnisse erbrachte die Bestimmung von IL-8 (s. Abb. 16): Durch Ausschaltung von p38 wurde die CpG-A- und CpG-B-induzierte IL-8 Produktion auf 34% des Ausgangswertes gedrosselt; dies entspricht einem Rückgang von 6248 pg/ μ l auf 1866 pg/ μ l für CpG-B und von 1131 pg/ μ l auf 350 pg/ μ l für CpG-A. Weniger klar war der Effekt der p38-Hemmung auf die Regulation von CD80 und CD86 (s. Abb. 16C, D). Lediglich für CpG-B ergab sich ein signifikanter Rückgang von CD80 auf 58% des nicht inhibierten Wertes; auch die CpG-A-induzierte, sehr viel schwächere CD80-Präsentation ging auf 68% des Ausgangswertes zurück, jedoch ließ sich hier keine Signifikanz erreichen. Über die Auswirkungen der p38-Hemmung auf CD86 lassen sich nach den vorliegenden Ergebnissen keine sicheren Aussagen treffen. Allenfalls tendenziell zeigte sich nach Stimulation mit CpG-B eine Hemmung (Rückgang auf 75% des Ausgangswertes), nach Stimulation mit CpG-A eine vermehrte Expression (Anstieg auf 112%).

Zusammenfassend ließen sich durch p38 Inhibition sowohl die CpG-A als auch die CpG-B induzierte IFN- α - und IL-8-Produktion in ähnlichem Ausmaß auf 30 – 45% der

Ausgangswerte drosseln, während der Effekt auf die Regulation von CD80 und CD86 geringer ausgeprägt war.

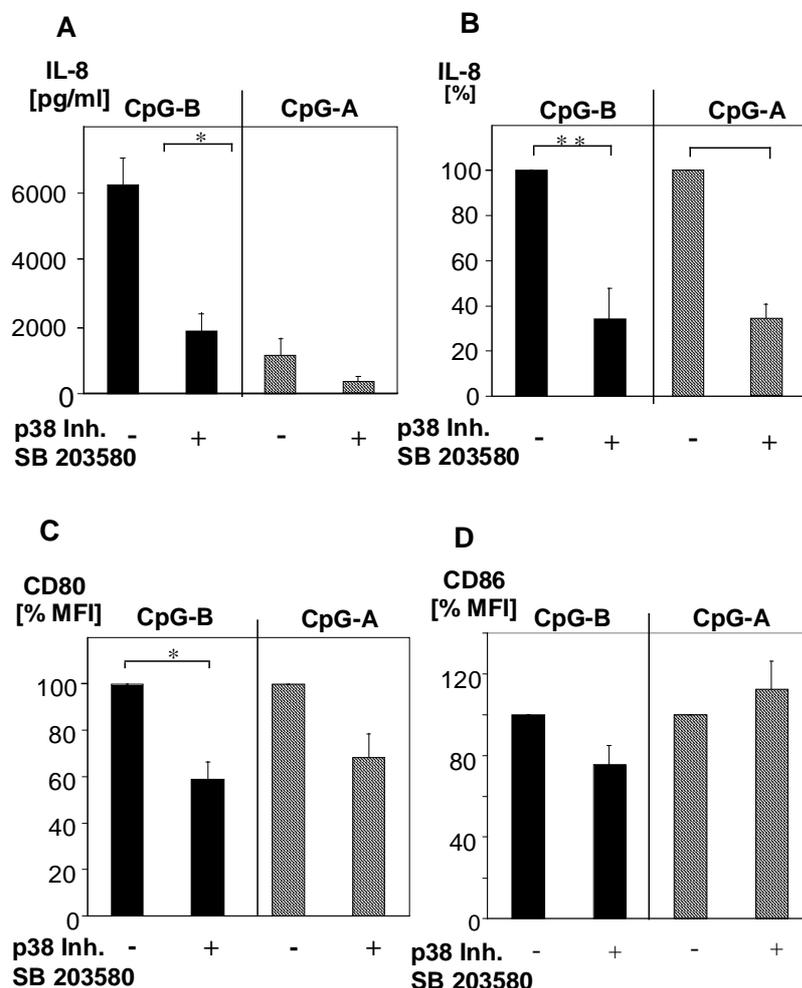


Abb.16 p38-Hemmung führt zur Verringerung der CpG-A- und der CpG-B-induzierten IL-8-Synthese und CD80- und CD86-Expression

Aus den Überständen des vorausgegangenen Versuches (s. Abb. 9) wurde im ELISA IL-8 bestimmt; gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus vier Spendern als Absolutwerte (A) sowie prozentuale Anteile der nicht-inhibierten Kontrollen (B). Die Zellen wurden in einer 4-Farben FACS-Analyse auf CD80 und CD86 untersucht. Wiederum sind die Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Anteile nach p38-Inhibition am Kontrollwert dargestellt. (* = $p < 0,05$)

3.2.3.2 Inhibition von JNK oder ERK hat keinen Einfluss auf die CpG-A- oder CpG-B-induzierte IFN- α -Produktion in der plasmazytoiden dendritischen Zelle

Neben der Beteiligung von p38 an der CpG-induzierten Signaltransduktion wurden auch die funktionelle Relevanz der nachgewiesenen Aktivierung von JNK und ERK weiter untersucht. Um die Existenz möglicher redundanter Signalwege innerhalb der MAP-Kinasen-Familie auszuschließen, setzten wir die für die drei Kinasen spezifischen

Inhibitoren auch in den drei möglichen Kombinationen paarweise ein, und zuletzt betrachteten wir die CpG-Effekte unter kompletter Blockade des MAP-Kinase-Weges. Aufgereinigte PDC wurden mit spezifischen Inhibitoren für JNK (JNK-Inhibitor) oder ERK (PD98059) oder den verschiedenen Kombinationen aus p38-, JNK- und ERK-Inhibitoren vorinkubiert und für 48h mit CpG-A oder CpG-B stimuliert. Als *readout* dienten analog der p38-Inhibition die Reduktion von IFN- α , IL-8 und CD80 und CD86.

Dabei kam es weder durch Inhibition von JNK noch durch ERK-Blockade zu einer relevanten Beeinflussung der CpG-A- oder CpG-B-induzierten IFN- α -Produktion (s. Abb. 17A): Unter Inhibition von JNK wurde die CpG-B-induzierte IFN- α -Produktion von 874 pg/ml auf 827 pg/ml gesenkt (95%), die CpG-A-induzierte Produktion von 29012 pg/ml auf 33531 pg/ml gesteigert (116%). Allerdings wichen für CpG-B zwei von vier Spendern deutlich von diesen Mittelwerten ab, was sich als Anstieg der CpG-B-induzierten IFN- α -Produktion zeigt, wenn die Mittelwerte der prozentualen Inhibition der einzelnen Spender dargestellt werden (s. Abb. 17B). Da dies jedoch nur durch die starke Abweichung zweier Spender zustande kam, kann das Ergebnis nicht im Sinne einer Steigerung der CpG-B-induzierten IFN- α -Produktion gewertet werden. Nach ERK-Blockade ergab sich ein der JNK-Inhibition entsprechendes Muster (s. Abb. 17 C,D). Ähnlich verhielt es sich für die gleichzeitige Hemmung von JNK und ERK; weder CpG-A noch CpG-B wurden durch Blockierung dieser Signalwege konstant in ihrer IFN- α -Induktion gestört (s. Abb. 17A); lediglich die prozentuale Darstellung zeigte wieder, dass es in zwei Spendern nach Hemmung von JNK und ERK zu einem Anstieg der IFN- α -Produktion kam (s. Abb. 17B).

Wie zu erwarten zeigte sich aber eine deutliche Hemmung der durch CpG-A und CpG-B induzierten IFN- α -Produktion, sobald durch die verschiedenen Inhibitor-Kombinationen auch p38 ausgeschaltet wurde. Inhibition von p38 und JNK nach CpG-B-Stimulation führte zu einer Abnahme von 874 pg/ μ l auf 202 pg/ μ l (entsprechend einem Rückgang auf 34%), Inhibition von p38 und ERK zu einer Abnahme auf 65 pg/ μ l (22%), im Vergleich zu einem Rückgang auf 111 pg/ μ l (48%) unter alleiniger p38-Inhibition. Ein etwas stärkerer Rückgang auf 43 pg/ μ l (16%) war durch Hemmung aller drei MAP-Kinase-Wege zu verzeichnen. Ein ähnliches Bild zeigte sich für CpG-A mit einer Verringerung von 29012 pg/ μ l auf 10585 pg/ μ l (32%) unter Blockade von p38 und JNK, auf 6754 pg/ μ l (19%) nach Inhibition von p38 und ERK, sowie einer Abnahme auf 4944 pg/ μ l (14%) nach Hemmung von p38, JNK und ERK (Rückgang auf 10844 pg/ μ l (29%) durch p38 Hemmung). Auch die IL-8-Produktion wurde durch Hemmung von JNK oder ERK nicht signifikant beeinflusst (s. Abb. 19). Gleichzeitige Inhibition von JNK und ERK führte zu einem Rückgang des CpG-B-induzierten IL-8 auf

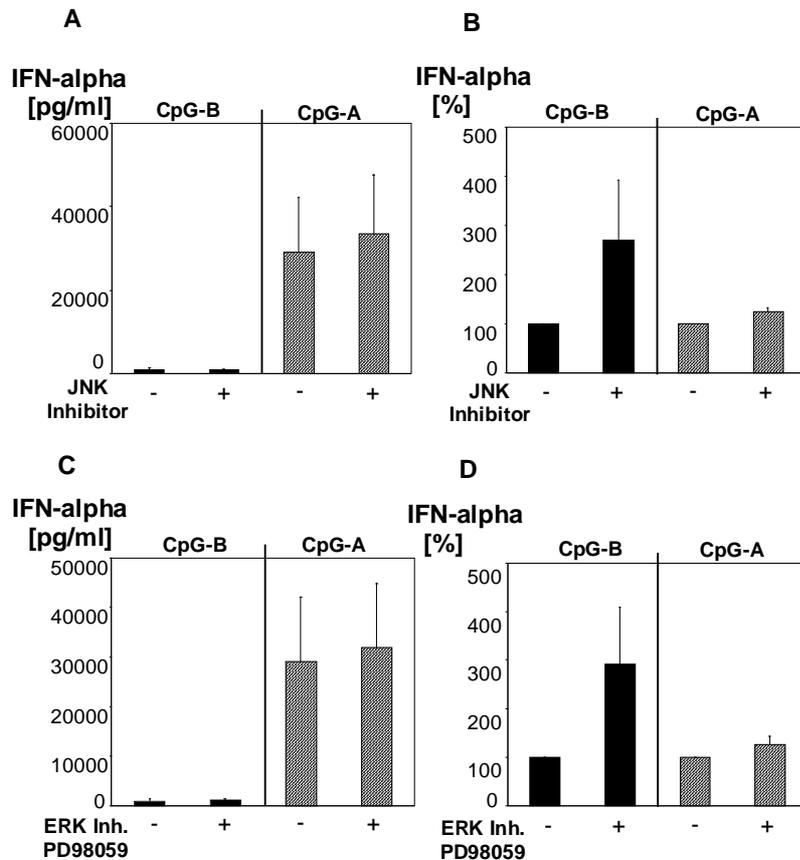


Abb.17 Keine Beeinflussung der IFN- α -Produktion durch Hemmung von JNK oder ERK

Aufgereinigte PDC (50.000 Zellen/Bedingung) wurden nach Vorinkubation mit dem jeweiligen spezifischen Inhibitor (JNK-Inhibitor, 2 μ M; ERK Inhibitor PD98059, 20 μ M) über 48 h mit 3 μ g/ml ODN 2006 bzw. ODN 2216 stimuliert. IFN- α wurde im ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von vier Spendern (A,C) bzw. die Mittelwerte der prozentualen Anteile nach Inhibition an den nicht-inhibierten Ausgangswerten (B,D). (* = $p < 0,05$)

58%, während die CpG-A-induzierte Produktion leicht gesteigert wurde (141%). Die simultane Ausschaltung von p38 und den anderen MAP-Kinasen führte zu einer der alleinigen p38-Hemmung (34% für beide CPG Klassen) vergleichbaren Restproduktion an CpG-A- und CpG-B-induziertem IL-8 von 13-32% (s. Abb. 20C).

Die CD80-Expression der PDC wurde durch Hemmung von JNK für beide CpG-Klassen eher positiv beeinflusst (s. Abb. 20): CpG-B-induziertes CD80 stieg auf 122% des Ausgangswertes, CpG-A-induziertes CD80 auf 135%. ERK-Blockade hingegen zeigte keinen Effekt auf die CD80-Expression. Für die kombinierte Hemmung mehrerer MAP-Kinasen ergaben sich hier ähnliche Ergebnisse wie für IFN- α und IL-8: Sobald auch p38 inhibiert wurde, zeigten die Zellen nur noch 51-75% der CD80-Moleküle im

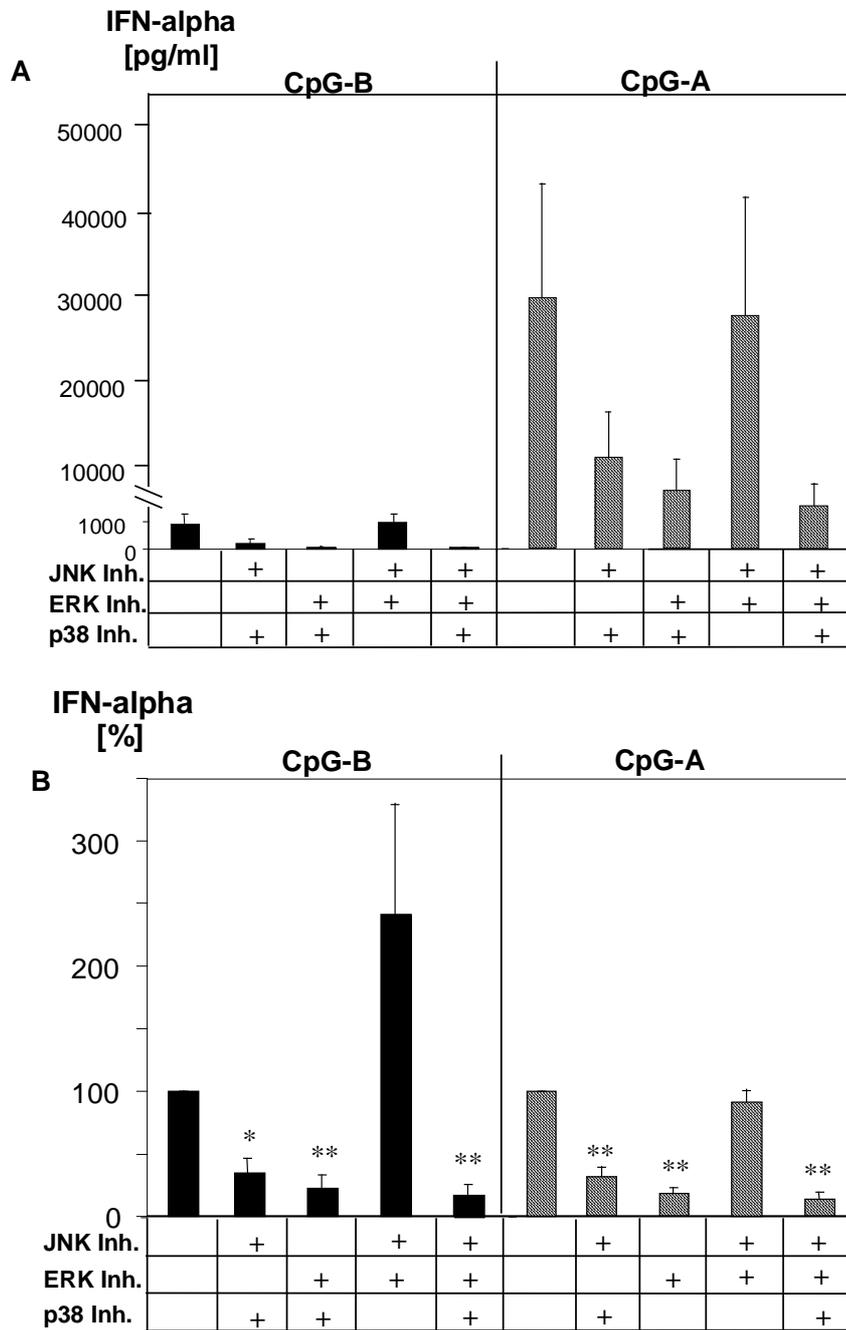


Abb.18 Simultane Hemmung von p38 und JNK bzw. ERK führt zu einer der alleinigen p38 Hemmung entsprechenden IFN- α -Induktion durch CpG-A und CpG-B
 Aufgereinigte PDC (50.000 Zellen/Bedingung) wurden 30 min mit den angegebenen Kombinationen der spezifischen Inhibitoren für p38, JNK und ERK (SB203580 6 μ M; JNK-Inhibitor 2 μ M; PD98059 20 μ M) vorinkubiert und dann für 48 h mit 3 μ g/ml ODN 2006 bzw. ODN 2216 stimuliert. IFN- α wurde im ELISA bestimmt. A zeigt die Mittelwerte + SEM aus vier Spendern, B die Mittelwerte der prozentualen Hemmung. (* = $p < 0,05$)

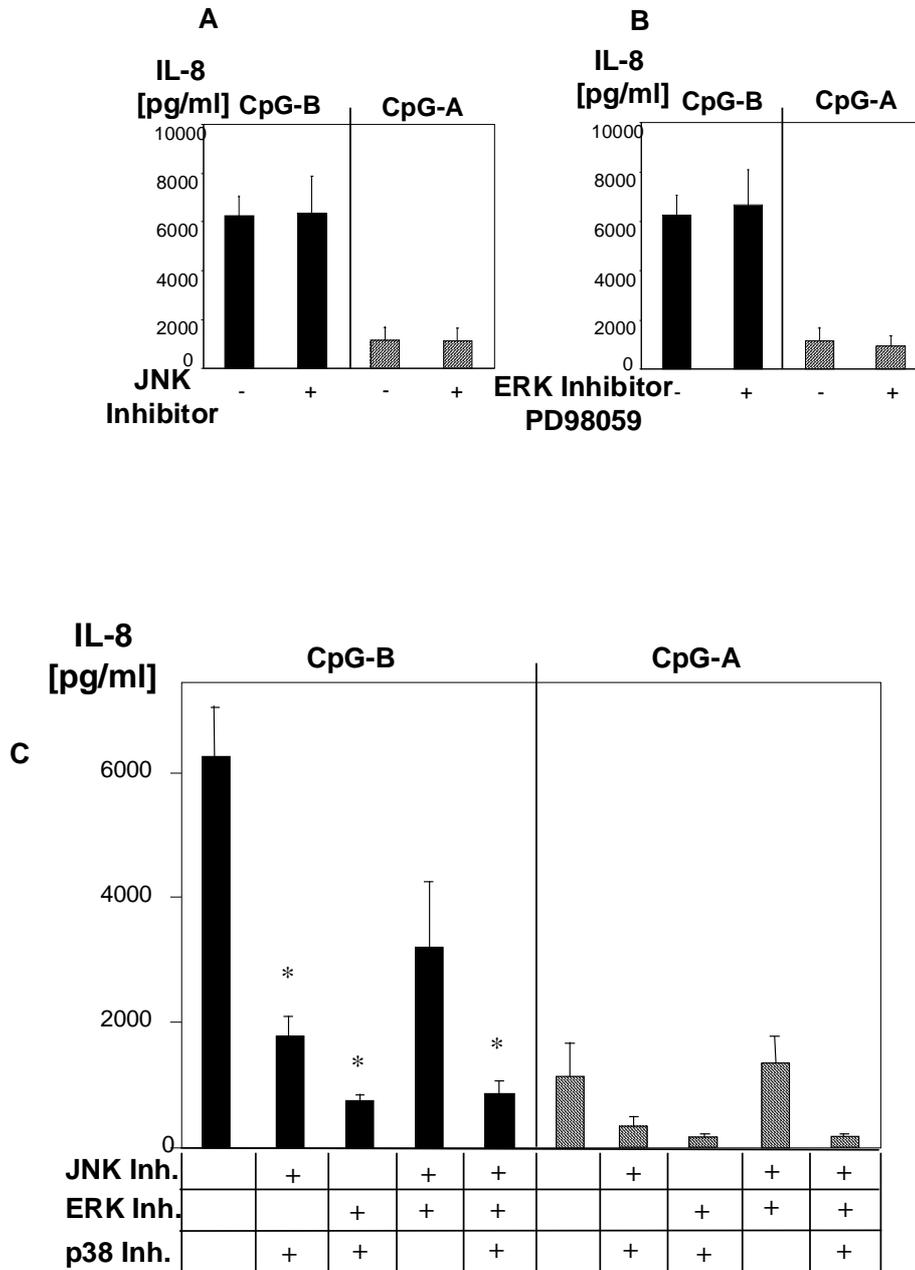


Abb.19 Inhibition von JNK oder ERK hat keinen Einfluss auf die CpG-A-oder CpG-B-induzierte IL-8-Produktion

Aus den Überständen des vorhergegangenen Versuches (s. Abb. 11, 12) wurde per ELISA IL-8 bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM aus vier Spendern. (* = $p < 0,05$)

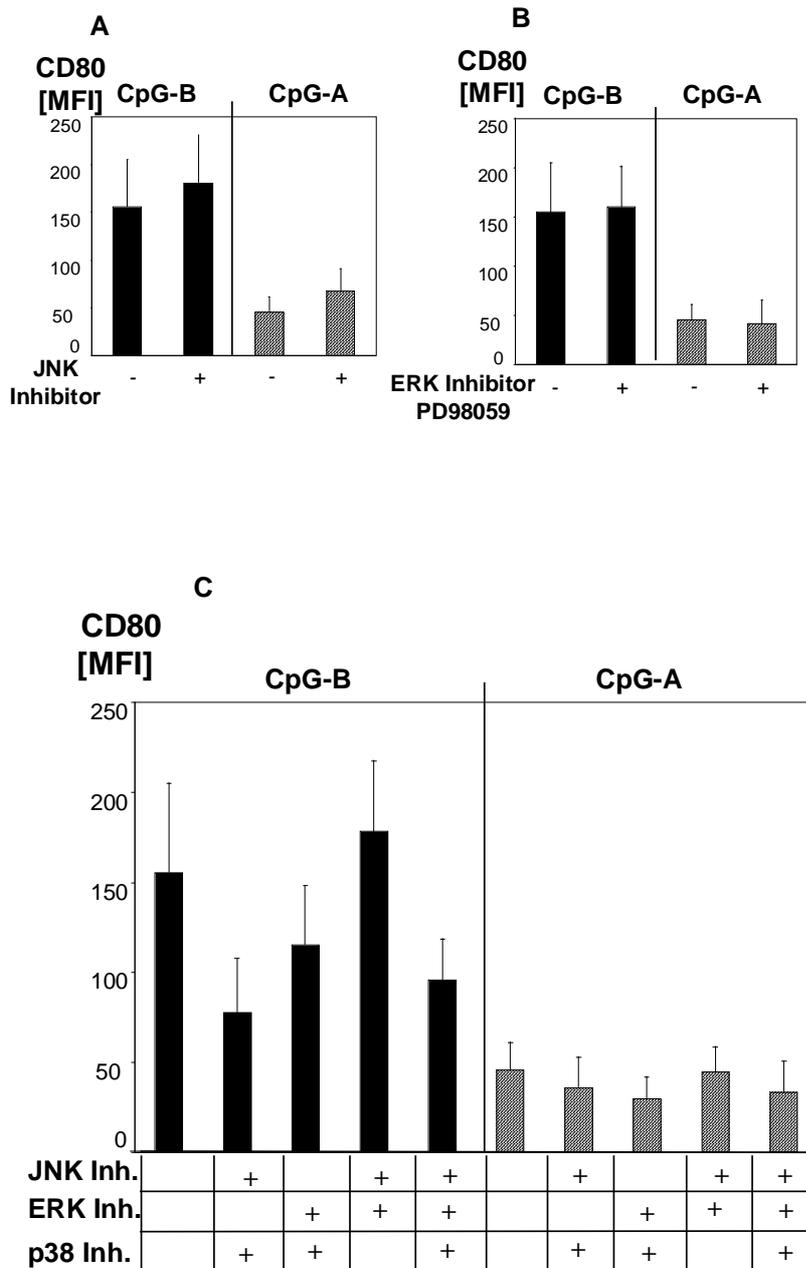


Abb.20 Hemmung von JNK oder ERK lässt die CD80-Regulation durch CpG-A und CpG-B unbeeinflusst

Die Zellen des bereits beschriebenen Experimentes (s. Abb. 11-13) wurden in einer 4-Farben FACS-Analyse auf CD80-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der JNK- bzw. ERK-Hemmung (A bzw. B) und der simultanen Inhibition mehrerer MAP-Kinasen (C) aus vier Spendern.

Vergleich zur nicht-inhibierten Kontrolle auf ihrer Oberfläche, während gleichzeitige Blockade von JNK und ERK keine Wirkung zeigte. Ein ähnliches Muster ergab sich für CD86; allerdings waren die Auswirkungen der Hemmung weniger deutlich und selbst p38-Blockade führte nicht immer zu einer Reduktion der CD86 Expression (Daten nicht gezeigt).

Abschließend lässt sich der Effekt der Hemmung der MAP-Kinasen-Familie in der PDC auf die IFN- α - und IL-8-Produktion sowie die Expression kostimulatorischer Moleküle wie folgt beschreiben: Lediglich die Inhibition von p38 verringerte die CpG-induzierte IFN- α - und IL-8-Produktion sowie die Expression von CD80 und 86, wohingegen die Hemmung von JNK und ERK keine signifikanten Wirkungen zeigte, die genannten *readouts* jedoch tendenziell positiv beeinflusste. Die gleichzeitige Blockade mehrerer MAP-Kinasen unterschied sich in ihrer Wirkung nicht wesentlich von der alleinigen p38-Hemmung. Besonders interessant für unsere Fragestellung ist hierbei, dass sich die Blockade der verschiedenen MAP-Kinasen gleichsinnig auf CpG-A und CpG-B induzierte Effekte auswirkte.

3.2.3.3 Inhibition von NF- κ B führt zu einer Verringerung der CpG-A-induzierten IFN- α -Produktion, aber zu einer Steigerung der CpG-B-induzierten IFN- α -Produktion

Um die funktionelle Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B für die IFN- α -Induktion zu untersuchen, wurden aufgereinigte PDC für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen eines spezifischen NF- κ B-Inhibitorpeptids, SN50, vorinkubiert und dann 48h in Anwesenheit des Inhibitors mit CpG-A oder CpG-B stimuliert. Mittels ELISA bestimmten wir IFN- α aus den Überständen sowie mittels Durchflusszytometrie die Expression von CD80 und CD86.

Dabei zeigte die Hemmung von NF- κ B entgegengesetzte Auswirkungen auf die CpG-A- und die CpG-B-induzierte IFN- α -Produktion: Nach Stimulation mit CpG-A führte Inkubation der PDC mit SN50 zu einem konzentrationsabhängigen Rückgang der IFN- α -Produktion von 21852 pg/ μ l auf 5700 pg/ μ l für die höchste eingesetzte Inhibitor-Konzentration (20 μ M), was einem Rückgang auf 27 % im Vergleich zur nicht inhibierten Kontrolle entspricht (s. Abb. 21A). Im Gegensatz hierzu stieg CpG-B-induziertes IFN- α nach Ausschaltung von NF- κ B ebenfalls in Abhängigkeit von der Inhibitor-Konzentration auf das bis zu 20fache des Ausgangswertes an; dies entspricht einem Zuwachs von 298 pg/ μ l auf 6202 pg/ μ l. Es resultieren also nach Hemmung von NF- κ B ähnliche Level an IFN- α nach Stimulation mit CpG-A und CpG-B. Abb. 21B zeigt noch einmal die gegenläufigen Effekte der NF- κ B Hemmung auf die CpG-A- und CpG-B-induzierte IFN- α -Produktion als prozentuale Anteile der nicht-inhibierten Ausgangswerte.

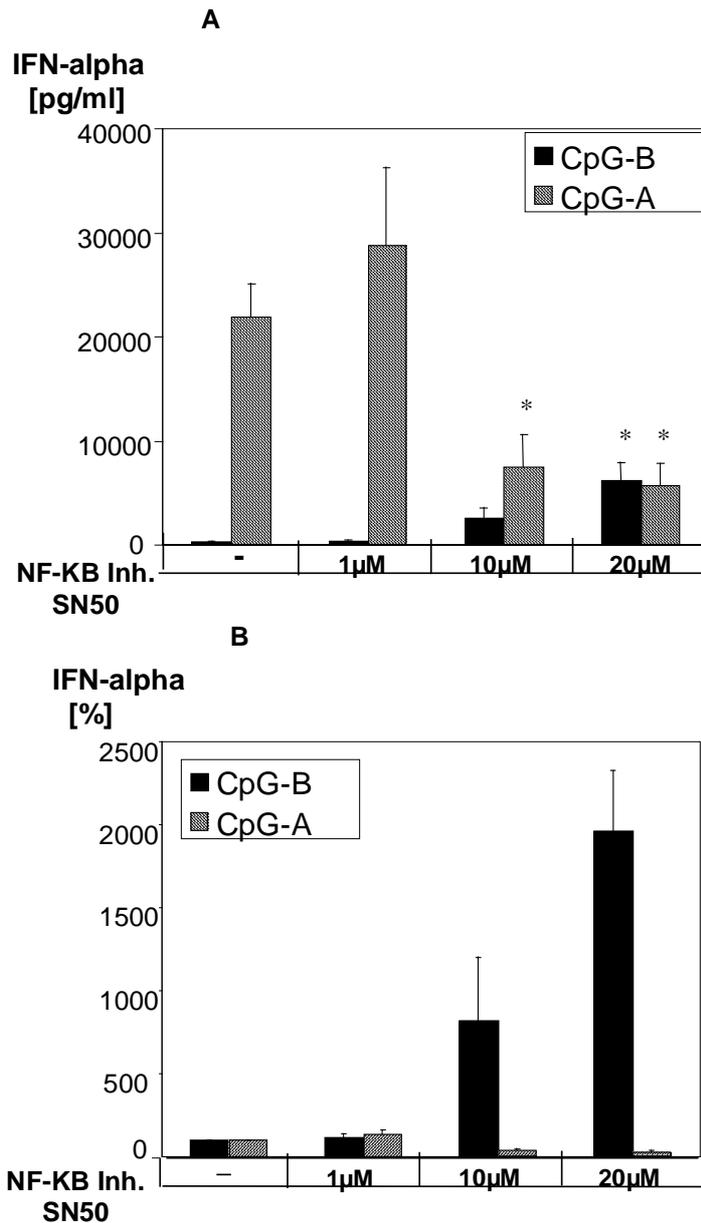


Abb.21 Inhibition von NF-κB führt zu einer Verringerung von CpG-A-induziertem IFN-α und einem Anstieg von CpG-B-induziertem IFN-α

Aufgereinigte PDC (50.000 Zellen/Bedingung) wurden nach 30-minütiger Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen des spezifischen NF-κB-Inhibitors SN50 48h lang in Anwesenheit des Inhibitors mit ODN 2006 bzw. ODN 2216 stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte der im ELISA bestimmten IFN-α-Produktion + SEM von vier Spendern A; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). B gibt die prozentualen Anteile an der nicht-inhibierten Kontrolle an.

Für die Regulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 lässt sich keine vergleichbare Dichotomie erkennen: Die starke Aktivierung der PDC durch CpG-B wird durch NF-κB-Hemmung tendenziell eher verringert; genauso geht die sowieso schon

schwache Expression kostimulatorischer Proteine nach Stimulation mit CpG-A durch SN50 noch weiter zurück. Dieser Rückgang ist – wenn auch nicht signifikant – stärker ausgeprägt als nach Stimulation mit CpG-B. (s. Abb. 22)

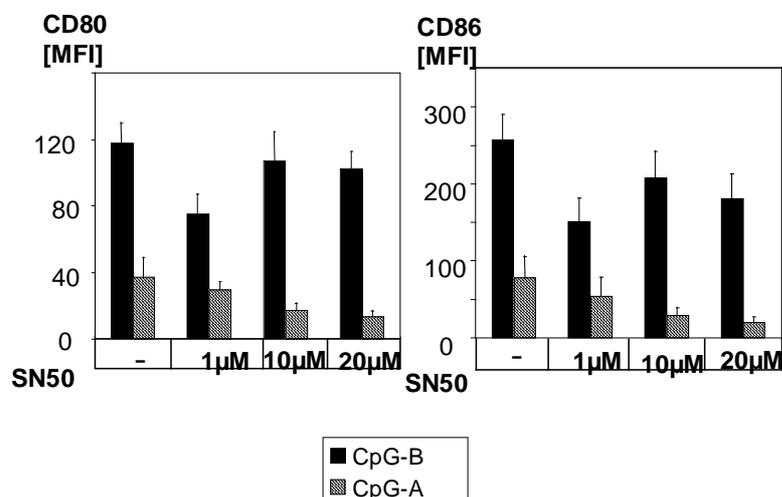


Abb. 22 Hemmung von NF- κ B führt zu einer leichten Verringerung der Expression von CD80 und CD86 nach Stimulation mit CpG-A und CpG-B

Die PDC des in Abb. 15 beschriebenen Versuches wurden in einer 4-Farben FACS-Analyse auf die Expression von CD80 und CD86 untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von vier Spendern.

Um die Relevanz der NF- κ B-Aktivierung im zeitlichen Verlauf der IFN- α -Induktion durch CpG-A und CpG-B näher eingrenzen zu können, betrachteten wir im folgenden Versuch die Effekte der NF- κ B-Hemmung zu verschiedenen Zeitpunkten der Stimulation. Wie im Vorversuch wurden aufgereinigte PDC für 48 h mit CpG-A oder CpG-B stimuliert; die Zugabe des NF- κ B-Inhibitors erfolgte 30 min vor der Stimulation sowie 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h und 12 h nach der Stimulation mit den CpG-ODN. Wieder bestimmten wir IFN- α sowie die Expression von CD80 und CD86 (nicht gezeigt).

Abb. 23A zeigt, dass nur die Vorinkubation mit SN50 einen Rückgang von CpG-A-induziertem IFN- α erzielte. Bereits bei Zugabe des Inhibitors 2h nach Beginn der Stimulation fand keine relevante Beeinflussung der IFN- α -Induktion durch CpG-A mehr statt, was ebenso für alle weiteren Zeitpunkte galt. Auch die Steigerung der IFN- α -Induktion durch CpG-B war maximal bei sofortiger NF- κ B-Blockade; hier ließ sich jedoch auch bei NF- κ B-Hemmung 2h bzw. 4h nach Stimulationsbeginn eine Beeinflussung der IFN- α -Produktion beobachten. Der Rückgang der Expression

kostimulatorischer Moleküle durch NF- κ B-Hemmung ließ sich nur durch sofortige Ausschaltung des Transkriptionsfaktors erreichen (stellvertretend CD80 in Abb. 23B).

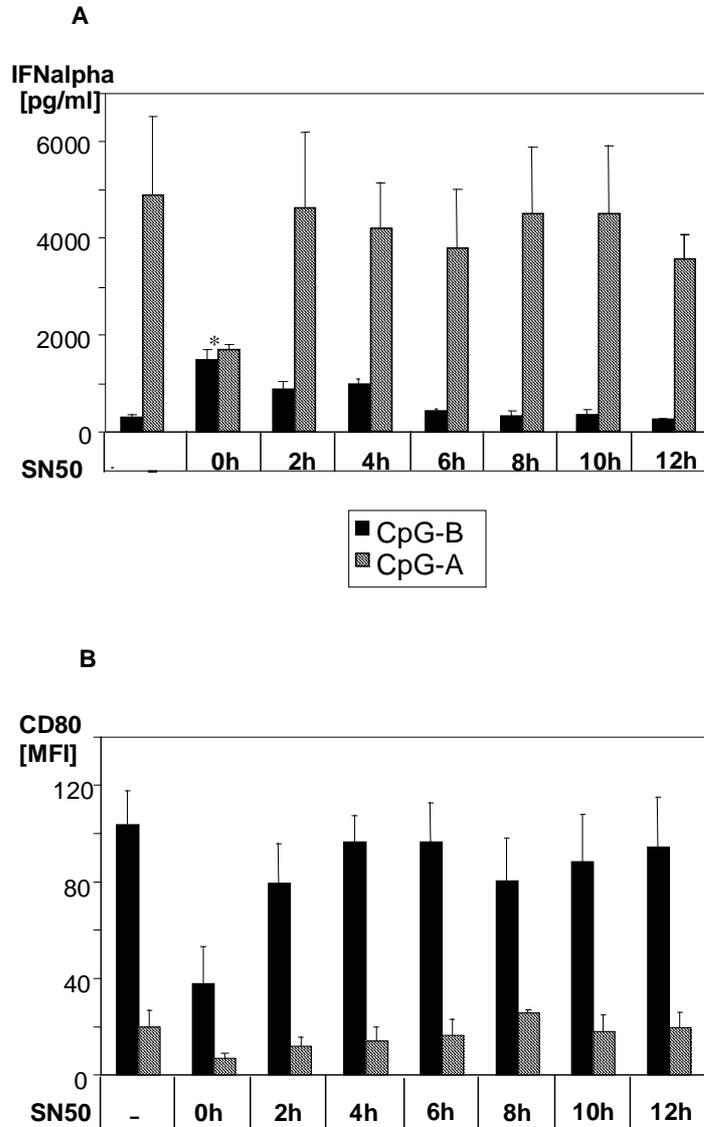


Abb. 23 Die beschriebenen Effekte der NF- κ B-Hemmung lassen sich nur durch sofortige Zugabe des Inhibitors erzielen

Aufgereinigte PDC (50.000 Zellen/Bedingung) wurden über 48h mit 3 μ g/ml ODN 2006 oder ODN 2216 stimuliert. Der Inhibitor SN50 (10 μ M) wurde 30 min vor Stimulation (0 h) bzw. 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12h nach Stimulation zu den Zellen gegeben. Mittels ELISA wurde die IFN- α -Produktion bestimmt, im FACS wurde die CD80-Expression gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM aus drei Spendern. (* = $p < 0,05$)

Eine NF- κ B-Hemmung in der PDC hat also unterschiedliche Auswirkungen auf Aktivierung und IFN- α -Produktion: Während die CD80/CD86 Kostimulation durch beide CpG-Klassen tendenziell verringert ist, wird die IFN- α -Induktion je nach Stimulus

entweder verstärkt oder gehemmt; dieser Effekt ist jedoch nur zu beobachten, wenn die Signalübertragung durch NF- κ B noch vor der Stimulation mit CpG gehemmt wird.

3.2.3.4 Die Hemmung von IL-10 zeigt keine Auswirkungen auf die IFN- α -Induktion durch CpG-A oder CpG-B in der PDC

Da die Ausschaltung von NF- κ B zu einem starken Anstieg der CpG-B-induzierten IFN- α Produktion führt (s. 3.2.3.2), muss NF- κ B offensichtlich auf direktem oder indirektem Wege an einer Hemmung der IFN- α -Induktion durch CpG-B beteiligt sein. Ein Zytokin, dass durch NF- κ B transkribiert wird und dem eher immunsuppressive Eigenschaften zugeschrieben werden, ist IL-10. Die Möglichkeit einer indirekten, autokrinen Hemmung von CpG-B-induziertem IFN- α über eine verstärkte Expression von IL-10 wurde im folgenden überprüft. Zu diesem Zweck inkubierten wir aufgereinigte PDC 30 min vor und während der Stimulation mit CpG-A und CpG-B mit einem IL-10-blockierenden Antikörper und bestimmten nach 48h IFN- α sowie die Expression von CD86.

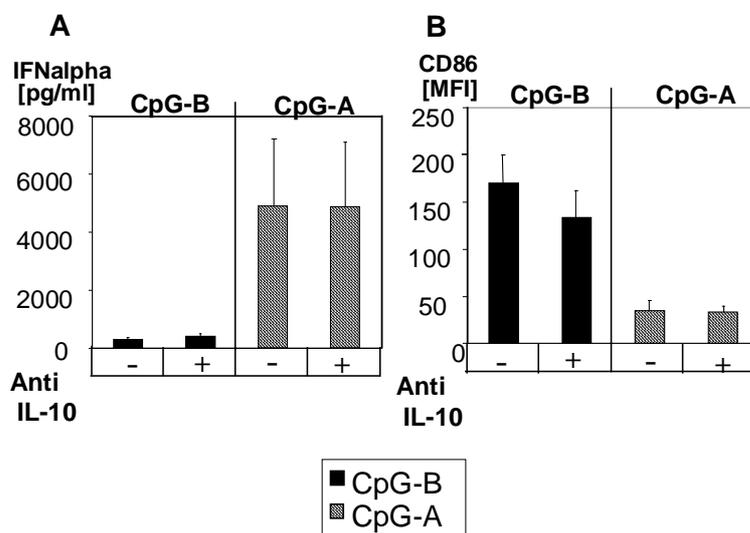


Abb.24 Blockierung von IL-10 hat keinen Einfluss auf die CpG-induzierte IFN- α -Produktion oder Aktivierung der PDC

Aufgereinigte PDC (50.000 Zellen/Bedingung) wurden nach 30minütiger Vorinkubation mit einem IL-10-blockierenden Antikörper für 48h mit 3 μ g/ml ODN 2006 oder ODN 2216 stimuliert. Die IFN- α -Produktion wurde im ELISA gemessen, die CD86-Expression wurde in einer 4-Farben FACS-Analyse bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM aus drei Spendern.

Es zeigte sich, dass die funktionelle Ausschaltung von IL-10 die Induktion von IFN- α durch CpG-B nicht beeinflusst (s. Abb. 24); gleiches gilt für die CpG-A-induzierte IFN- α -Produktion. Auch die Expression von CD86 war in unserem Versuch IL-10-unabhängig.

4. DISKUSSION

Die Beeinflussung des menschlichen Immunsystems durch immunostimulatorische DNA stellt einen vielversprechenden Ansatz in der Immuntherapie dar. Aktuell wird die Wirksamkeit von CpG-ODN in einer Vielzahl von Studien in Mäusen, in Primaten und am Menschen erprobt. Die wichtigsten Anwendungsgebiete für CpG-ODN sind dabei

- die Krebstherapie
- die Unterstützung einer effektiven spezifischen Immunantwort nach Impfungen
- die Therapie allergischer Erkrankungen und
- die Therapie bestehender Infektionen durch unspezifische Immunmodulation.

Im Rahmen der Tumorthherapie werden CpG-ODN alleine (Carpentier, Xie et al. 2000) oder in Kombination mit Tumorantigen (Davila and Celis 2000), Antikörpern (van Ojik, Bevaart et al. 2003) oder dendritischen Zellen (Heckelsmiller, Beck et al. 2002) eingesetzt. Zu den behandelten Tumoren zählen dabei u.a. Bronchial-Karzinome (http://www.coleypharma.com/coley/cpg_7909), Neuroblastome, Gliome, Melanome, Colon-Carcinome und Lymphome. Als Impf-Adjuvans konnte CpG-DNA in Mäusen beispielsweise die Immunantwort gegen Viren wie Hepatitis B und Influenza (Davis, Weeratna et al. 1998; Moldoveanu, Love-Homan et al. 1998) beschleunigen und verstärken. In Primaten wurde CpG als Adjuvans in Impfungen gegen Milzbrand (Klinman 2004), Hepatitis B (Davis, Suparto et al. 2000), Malaria (Jones, Obaldia et al. 1999) und Leishmanien (Verthelyi, Kenney et al. 2002) erprobt. Bezüglich der Therapie allergischer Erkrankungen beschäftigen sich Studien vor allem mit Erkrankungen des Respirationstraktes wie Asthma bronchiale (Santeliz, Van Nest et al. 2002). Die Induktion einer erfolgreichen Immunabwehr durch CpG gegen Listerien, Francisella, Herpes-Viren und Leishmanien konnte in Mäusen gezeigt werden (Zimmermann, Egeter et al. 1998; Klinman, Conover et al. 1999; Pyles, Higgins et al. 2002; Ishii, Ito et al. 2005), wobei auch in Primaten Schutz vor Leishmanien bestand (Verthelyi, Gursel et al. 2003). Zur therapeutischen Anwendung von CpG-DNA im Menschen laufen derzeit mehrere Phase I- und einige Phase II-Studien. Während ein klarer Benefit von der Verabreichung von CpG als Adjuvans bei Impfungen gegen Hepatitis B und Influenza gezeigt werden konnte, steht der Nachweis der Wirksamkeit in der Therapie bestehender Infektionen noch aus (Cooper, Davis et al. 2004; Halperin, Dobson et al. 2006).

In der überwiegenden Mehrzahl der aufgeführten Studien wurden von den verschiedenen existierenden CpG-ODN ausschließlich Typ-B-ODN als immunstimulatorische DNA verwendet. Dies ist unter anderem dadurch zu erklären, dass die Herstellung und der pharmakologisch genau definierte Einsatz von CpG-A

aufgrund der spontanen Formation höhermolekularer Strukturen schwierig ist. Es zeichnet sich jedoch immer deutlicher ab, dass verschiedene Arten von CpG-ODN unterschiedliche biologische Wirkungen vermitteln. Eine Einteilung in drei Klassen anhand der jeweiligen charakteristischen Effekte auf die B-Zelle und die PDC ist mittlerweile gut etabliert. Im Vordergrund steht dabei für CpG-A die starke IFN- α -Induktion in der PDC (Krug, Rothenfusser et al. 2001), während CpG-B nur geringe Mengen an IFN- α induziert, aber B-Zellen und PDC sehr effizient aktiviert (Hartmann and Krieg 2000); Hauptmerkmal von CpG-C stellt die Vereinigung dieser Charakteristika auf eine CpG-Klasse dar (Hartmann, Battiany et al. 2003). Auch in einer der wenigen Studien, welche die therapeutische Aktivität verschiedener CpG-ODN verglichen, zeigten sich unterschiedliche Effekte der *in vivo*-Anwendung. In einem Fall erwies sich beispielsweise bezüglich der Leishmanien-Impfung in Primaten CpG-A gegenüber CpG-B als das überlegene Adjuvans (Verthelyi, Kenney et al. 2002). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nur der gezielte Einsatz der verschiedenen CpG-Klassen erlauben wird, das therapeutische Potenzial dieses Immunstimulans voll auszuschöpfen.

Zusammenfassung von Zielsetzung und Ergebnissen: Aktuell sind noch weite Bereiche der Wirkungen und der molekularen Wirkmechanismen der CpG-Klassen unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, einen Beitrag zur weiteren Aufklärung der spezifischen Effekte von CpG-A und CpG-B zu leisten und die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen. Da die PDC im Gegensatz zur B-Zelle von beiden CpG-Klassen nachhaltig beeinflusst wird, bot es sich an, Effekte und Mechanismen vorwiegend an dieser Zellpopulation zu vergleichen. Als wichtigsten *read-out* untersuchten wir die IFN- α -Produktion, die als eine Hauptfunktion der PDC angesehen wird und in deren Induktion sich CpG-A und CpG-B deutlich unterscheiden.

Wir konnten dabei zeigen, dass sowohl CpG-A als auch CpG-B eine frühe Phase der IFN- α -Produktion induzieren, die sich hinsichtlich Ausmaß und Zusammensetzung der IFN- α -Subtypen (s. Abb.10) nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Nur nach Stimulation mit CpG-A jedoch hält die Produktion von IFN- α an, wobei es in der späten Phase zur Induktion deutlich größerer Mengen an IFN- α kommt (s. Abb.7, 9), die sich auch qualitativ im Subtypenmuster von der frühen Phase unterscheiden (s. Abb.10). Diese verschiedenen Phasen der IFN- α -Produktion zeigen sich auch in der Phosphorylierung von Stat1, die für CpG-A erst mit Verzögerung zu beobachten ist (s. Abb.14). Dieser verspätete Eintritt von CpG-A-Effekten gegenüber den Wirkungen von CpG-B lässt sich auch für andere Parameter, wie IL-8-Produktion oder Regulation kostimulatorischer Moleküle, zeigen (s. Abb.8). Sowohl die CpG-A- als auch die CpG-B-induzierte IFN- α -Produktion erweisen sich abhängig von p38-Aktivierung (s. Abb.15),

während sich andere Mitglieder der MAP-Kinase-Familie, wie JNK und ERK, unbeteiligt zeigen. Auch eine simultane Blockierung mehrerer MAP-Kinasen kann die Hemmung der IFN- α -Produktion nicht verstärken (s. Abb.18). In der B-Zelle entspricht der fehlenden Stimulation und Zytokin-Induktion durch CpG-A auf Signaltransduktionsebene die ausbleibende Aktivierung von p38, JNK und I κ B; auf CpG-B hin können wir ihre Phosphorylierung und damit Aktivierung bestätigen (s. Abb.11). Den wichtigsten Hinweis auf die Hintergründe der unterschiedlichen CpG-Wirkung lieferte die Blockierung von NF- κ B, die unterschiedliche Auswirkungen auf die CpG-A- und die CpG-B-induzierte IFN- α -Produktion hat: Während die CpG-A-induzierte IFN- α -Produktion stark abnimmt, kommt es zu einer Steigerung des CpG-B-induzierten IFN- α (s. Abb.21). Interessanterweise resultieren ähnliche Level an IFN- α für beide CpG-Klassen. Der beschriebene Effekt auf die CpG-A-induzierte IFN- α -Produktion kann dabei nur durch eine sofortige NF- κ B-Hemmung erreicht werden; eine Steigerung der IFN- α -Induktion durch CpG-B kann hingegen auch durch eine Blockierung nach wenigen Stunden erzielt werden (s. Abb.23). Eine gleichzeitige Produktion von IL-10, das als autokriner Faktor die Produktion von IFN- α in der späten Phase nach Stimulation mit CpG-B hemmen könnte, wurde nicht nachgewiesen (s. Abb.24).

4.1 Unterschiede der IFN- α -Induktion in der PDC durch CpG-A und CpG-B

4.1.1 Unterschiedliche Kinetiken der IFN- α -Produktion in der PDC nach Stimulation mit CpG-A und CpG-B

Die unterschiedlichen Kinetiken der CpG-A- und CpG-B-induzierten IFN- α -Produktion in der PDC sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene werden durch die Ergebnisse anderer Gruppen bestätigt. In Einklang mit der Arbeit von Wang et al., die einen Rückgang der IFN- α -RNA ab 12 h nach Stimulation mit CpG-B auf Kontrollwerte nach 24 h beschreibt, (Abel, Wang et al. 2005), konnten wir nach 5 h CpG-Stimulation IFN- α -RNA deutlich nachweisen, während diese nach 24 h vollständig verschwunden war. Auf Proteinebene war eine lang anhaltende IFN- α -Produktion für mindestens 24 h nach Stimulation mit CpG-A bekannt (Kerkmann, Rothenfusser et al. 2003). Unsere genaue Analyse der CpG-A- und CpG-B-induzierten IFN- α -Produktion bis 48 h nach Stimulation ergab eine Verzögerung der IFN- α -Produktion für CpG-A; ab 10h nach Stimulation hob sich jedoch der starke CpG-A-vermittelte IFN-Anstieg deutlich von dem erreichten Plateau nach Stimulation mit CpG-B ab.

Neben IFN- α wurden die Kinetiken der Induktion von IL-8 und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nach Stimulation mit CpG-A und CpG-B bestimmt. Dieser Vergleich sollte zeigen, ob die unterschiedlichen Kinetiken der IFN- α -Induktion durch CpG-A und CpG-B ein allgemein gültiges zeitliches Muster der Aktivierung der PDC durch die beiden CpG-Typen widerspiegeln, oder ob es sich hierbei um ein spezifisches Charakteristikum der IFN- α -Induktion in der PDC handelt. Es zeigte sich auch für die Expression kostimulatorischer Moleküle ein verzögerter Stimulationseffekt durch CpG-A: Während eine Aufregulation von CD80 und CD86 bereits nach 9 h Stimulation mit CpG-B erfolgte, war ein derartiger Effekt für CpG-A erst nach 22 h zu verzeichnen. Auch bezüglich der IL-8-Produktion induzierte CpG-B einen früheren Anstieg als CpG-A (5h vs. 9 bis 11 h), wenn die Unterschiede hier auch nicht so deutlich waren wie für die anderen Parameter. Im Gegensatz zum Plateau der IFN- α -Produktion nach Stimulation mit CpG-B stiegen IL-8 und die Expression kostimulatorischer Moleküle jedoch über 48 h hin kontinuierlich an.

4.1.2 Unterschiedliche Phasen der IFN- α -Produktion in der PDC

Für die IFN- α -Produktion in der PDC wurde bereits ein Ablauf in zwei Phasen postuliert, die sich durch bestimmte Charakteristika auszeichnen: Während die frühe Phase der IFN- α -Produktion durch CpG-A und CpG-B induziert wird, schließt sich nur nach Stimulation mit CpG-A eine späte Phase an, während der erst große Mengen an IFN- α generiert werden können (Kerkmann, Rothenfusser et al. 2003). Um diese postulierte Phasen, deren Existenz wir bereits durch unsere Beobachtungen zur Kinetik der IFN- α -Induktion stützen konnten, näher zu charakterisieren, wurde die Zusammensetzung der IFN- α -Subtypen zu verschiedenen Zeiten nach Stimulation mit CpG-ODN analysiert. Die beiden Zeitpunkte wurden dabei mit der Absicht ausgewählt, die IFN- α -Transkription beider beschriebener Produktionsphasen zu analysieren. Dabei zeigte sich, dass CpG-A und CpG-B während der frühen IFN- α -Produktion zahlreiche Subtypen mit einem ähnlichen Verteilungsmuster induzieren. Die fortdauernde IFN- α -Induktion durch CpG-A zeichnete sich durch ein neues Muster an Subtypen mit einem deutlichen *shift* zu IFN- α 1 aus, welches dann 40% der exprimierten Subtypen ausmachte.

Die Auswirkungen der Existenz von mindestens 13 verschiedenen IFN- α -Subtypen waren lange umstritten; unterschiedliche Funktionen wurden ebenso diskutiert wie eine erleichterte quantitative Regulation durch Genduplikation. Aktuell wird zunehmend von einer genau geregelten Expression und fein abgestimmten Effekten der verschiedenen Subtypen ausgegangen. Während bereits länger bekannt ist, dass verschiedene Viren unterschiedliche IFN- α -Subtypen induzieren (Hiscott, Cantell et al. 1984), konnte der

Mechanismus dieser Selektivität durch den Nachweis einer differenzierten Subtypenexpression durch den Einsatz verschiedener IRF weiter aufgeklärt werden (Barnes, Moore et al. 2001). Die differenzierte Initiierung von Signalen durch verschiedene Typ I IFN über nur einen Rezeptor wird zumindest z.T. über unterschiedliche Bindungsaffinitäten vermittelt (Slutzki, Jaitin et al. 2006). Es existieren auch Hinweise auf eine unterschiedliche Wirksamkeit der IFN- α -Subtypen im therapeutischen Einsatz, beispielsweise gegen HCV (Koyama, Sakamoto et al. 2005). Spezifische Funktionen einzelner IFN- α -Subtypen in der Regulation der IFN- α -Produktion konnten in Maus-Fibroblasten gezeigt werden. Dabei wurde in der frühen Phase der IFN- α -Produktion nur IFN- α 4 erzeugt, welches zusammen mit IFN- β den positiven *feedback loop* mit Produktion eines breiten Spektrums an Subtypen triggerte (Marie, Durbin et al. 1998). In der menschlichen PDC konnte bis jetzt die Produktion einer Vielzahl an IFN- α -Subtypen nach Stimulation mit Viren (Izaguirre, Barnes et al. 2003) und einem CpG-ODN (AAC-30) nachgewiesen werden (Coccia, Severa et al. 2004).

Der Nachweis eines veränderten Subtypenprofils der späten IFN- α -Produktion stärkt die These, dass es sich bei der späten IFN- α -Produktion nicht lediglich um die Fortführung der Produktion zu rein quantitativem Zweck handelt; vielmehr zeichnet sich diese späte Phase durch eine spezifische Zusammensetzung des produzierten IFN- α und eine spezifische Regulation aus. Angesichts der unterschiedlichen therapeutischen Wirksamkeit verschiedener IFN- α -Subtypen wäre auch ein Vergleich des Expressionsmusters der beiden CpG-Klassen interessant, die potent IFN- α induzieren, CpG-A und CpG-C.

4.1.3 Qualitativ unterschiedliche Phasen der IFN- α -Produktion in der PDC als Ausdruck eines differenziert regulierten Rückkopplungsmechanismus nach Stimulation mit CpG-ODN

Die Notwendigkeit eines auto-/parakrinen *feedback loop* für die starke IFN- α -Produktion in der PDC bleibt weiterhin umstritten. Während die Ergebnisse in IFNAR-/- und IRF-9-/- Mäusen auf die Notwendigkeit des autokrinen *feedback* hinweisen (Honda, Yanai et al. 2005), lassen andere Arbeiten in Mäusen diesen unnötig erscheinen (Prakash, Smith et al. 2005). In humanen PDC führten blockierende IFNAR-Antikörper zu einer starken Beeinträchtigung der CpG-A-induzierten IFN- α -Produktion, während die geringe IFN- α -Induktion durch CpG-B unbeeinflusst blieb (Kerkmann, Rothenfusser et al. 2003); somit scheint der Einsatz einer positiven Rückkopplung über IFN- α auch ein wichtiges Merkmal der unterschiedlichen

Wirkmechanismen von CpG-A und CpG-B zu sein. Auch wenn diese Arbeit nicht darauf angelegt war, die Existenz eines parakrinen *feedback*-Mechanismus zu beweisen, so ergeben sich doch aus der genaueren Charakterisierung der IFN- α -Induktion deutliche Hinweise auf dessen Notwendigkeit für die CpG-A-induzierte IFN- α -Produktion:

1. Während sich die frühe IFN- α -Produktion für beide CpG-Klassen bis auf eine Verzögerung der Induktion durch CpG-A nicht wesentlich unterscheidet, induziert nur CpG-A eine lange, über 10h hinaus anhaltende IFN- α -Produktion starken Ausmaßes.
2. Die späte Phase der IFN- α -Produktion durch CpG-A zeichnet sich durch ein verändertes Muster an IFN- α -Subtypen aus, welches v.a. durch IFN- α 1 geprägt ist und welches nicht durch CpG-B induziert wird.
3. Die stärkere Expression und Phosphorylierung von Stat1 8h nach Stimulation mit CpG-A stimmt mit der Annahme einer auto-/parakrinen Aktivierung der PDC über den IFNAR überein.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse scheint der Ablauf in qualitativ unterschiedlichen Phasen ein wichtiges Charakteristikum der CpG-A-induzierten IFN- α -Produktion zu sein, welches einen deutlichen Unterschied zur IFN- α -Regulation durch CpG-B darstellt und bei Erklärungsmodellen der Wirkmechanismen nicht außer Acht gelassen werden darf. In Zusammenschau mit bereits bekannten Daten (Kerkmann, Rothenfusser et al. 2003; Honda, Yanai et al. 2005) schließen wir uns dabei der These eines positiven Rückkopplungsmechanismus über den IFNAR nach Stimulation mit CpG-A an, der zur lang andauernden IFN- α -Produktion in großen Mengen und mit einer charakteristischen Subtypenverteilung führt. Im Gegensatz zu der in Maus-Fibroblasten beschriebenen Beschränkung der Expression von IFN- α 4 und IFN- β konnten wir bereits während der frühen Phase die Expression eines breiten Spektrums an IFN- α -Subtypen nachweisen; diese konnten sowohl durch CpG-A als auch durch CpG-B induziert werden. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Tatsache, dass in der PDC im Gegensatz zu anderen Zelltypen IRF-7 konstitutiv exprimiert (Dai, Megjugorac et al. 2004) und als hauptverantwortlich für die IFN- α -Produktion angesehen wird; IRF-3 scheint hierbei entbehrlich zu sein (Honda, Yanai et al. 2005). Da die Bindungssequenz von IRF-7, anders als für IRF-3, nicht streng auf einige wenige Subtypen restringiert ist (Lin, Genin et al. 2000), wäre die Induktion einiger weniger IFN- α -Subtypen durch IRF-7 auch nicht zu erwarten. Auch wenn die frühe Phase der IFN- α -Produktion nach Stimulation mit CpG-B in der PDC abläuft, scheint die für CpG-A beschriebene positive Rückkopplung hier nicht stattfinden zu können. Mögliche Erklärungsmodelle sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.2 Modellvorstellungen der unterschiedlichen Wirkmechanismen von CpG-A und CpG-B

Die genauen Mechanismen der unterschiedlichen Effekte von CpG-A und CpG-B auf die B-Zelle und die PDC sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Aus der immer exakteren Charakterisierung der beiden CpG-Klassen und den wachsenden Erkenntnissen zur TLR9-vermittelten Signaltransduktion lassen sich jedoch allmählich mögliche Modelle der molekularen Abläufe konstruieren. Zur Erkennung der CpG-ODN über TLR9 und der Initiierung der Signalkaskade über die Rekrutierung von Adaptermolekülen bestehen bereits relativ gut gesicherte Vorstellungen. Auch für den Einsatz des IFNAR und der verschiedenen IRF existieren interessante Daten, die vor allem in *knock out*-Mäusen gewonnen wurden. Relativ unbekannt ist hingegen noch die genaue Verknüpfung der Schritte, die am Anfang bzw. gegen Ende der Signalkaskade liegen, sowie der Einfluss möglicher modulierender Faktoren. In der Annahme, dass wichtige Einflussgrößen für die differenzierte Wirkung der CpG-Klassen in diesem Bereich zum Tragen kommen, lag der Fokus dieser Arbeit hauptsächlich auf zwei Gruppen von Signaltransduktionsmolekülen, die bekanntermaßen von TLR9 aktiviert werden und deren Wirkungen im mittleren Bereich des Signalweges anzusiedeln sind, nämlich den MAP-Kinasen und NF- κ B. Während das Hauptinteresse dabei auf der PDC als Zielzelle beider CpG-Klassen lag, war auch interessant zu erkennen, wie sich die fehlende Stimulation der B-Zelle durch CpG-A auf Signaltransduktionsebene niederschlug. Im Folgenden soll versucht werden, vor dem Hintergrund unserer eigenen Ergebnisse und der bisherigen Erkenntnisse ein Modell der Signaltransduktion in der PDC von der Aktivierung von TLR9 durch CpG-DNA bis zur IFN- α -Produktion aufzustellen und dabei Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Wirkungen von CpG-A und CpG-B zu liefern.

4.2.1 Subzelluläre Lokalisation, Rezeptorbindung und Aktivierung von Signaltransduktionswegen durch CpG-A und CpG-B

4.2.1.1 Aufnahme in die Zelle und Bindung an TLR9

Alle TLR, die Nukleinsäuren erkennen (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9), sind in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert. Im Gegensatz dazu befinden sich die anderen TLR auf der Zelloberfläche. Für TLR9 konnte gezeigt werden, dass eine künstlich forcierte Translokation an die Oberfläche zwar nicht die Erkennung von CpG-DNA stört, dafür aber zur Stimulation durch Wirts-DNA führt; folglich scheint die

intrazelluläre Lokalisation keine Vorbedingung der Aktivierung darzustellen, sondern der Spezifität und der Verhinderung einer überschießenden Aktivierung durch körpereigene Nukleinsäuren zu dienen (Barton, Kagan et al. 2006). Innerhalb der Zelle befindet sich TLR9 im unstimulierten Zustand in Endosomen und im Endoplasmatischen Retikulum (Ahmad-Nejad, Hacker et al. 2002; Latz, Schoenemeyer et al. 2004) und wird nach Stimulation in lysosomale Kompartimente transloziert (Barton, Kagan et al. 2006). Auch für CpG-DNA konnte nach Aufnahme in die Zelle eine Verlagerung in Lysosomen gezeigt werden (Ahmad-Nejad, Hacker et al. 2002). Dabei kann die Aktivierung durch CpG-DNA durch Immobilisierung der CpG-ODN oder Blockierung der endosomalen Ausreifung verhindert werden (Hacker, Mischak et al. 1998; Manzel and Macfarlane 1999). Der Mechanismus der Aufnahme von CpG-ODN in die Zelle ist noch größtenteils unbekannt; es konnte eine Abhängigkeit des ATP-verbrauchenden Prozesses von der Aktivierung der Phosphatidylinositol 3`-Kinase (PI3K) gezeigt werden (Ishii, Takeshita et al. 2002; Kuo, Lin et al. 2006).

Die meisten der beschriebenen Ergebnisse wurden für CpG-B ermittelt. Bis zur Bindung an TLR9 wird für CpG-A aber ein ähnlicher Mechanismus angenommen (Kerkmann, Costa et al. 2005). Auch wird Stimulation durch beide CpG-Klassen über TLR9 vermittelt (Hemmi, Kaisho et al. 2002).

4.2.1.2 Räumlich-zeitlicher Ablauf der TLR9-Aktivierung in Abhängigkeit von der Bildung höhermolekularer CpG-Strukturen

Trotz der Bindung an einen gemeinsamen Rezeptor finden sich schon seit längerem Hinweise auf eine unterschiedliche intrazelluläre Verteilung der beiden CpG-Klassen. So wurde - neben der Kolo-kalisation geringer Mengen beider CpG-Klassen - der eher diffusen Verteilung von CpG-B eine auf kleinere Orte beschränkte Lokalisation von CpG-A gegenüber gestellt (Gursel, Verthelyi et al. 2002). Jetzt konnte gezeigt werden, dass CpG-A für Stunden in endosomalen Kompartimenten verweilt, während CpG-B zügig in die Lysosomen transportiert wird (Honda, Ohba et al. 2005). Die lange Verweildauer von CpG-A im Endosom war dabei Voraussetzung einer starken IFN- α -Induktion. Erstaunlicherweise konnte durch Zurückhalten von CpG-B im Endosom eine CpG-A vergleichbare IFN- α -Produktion erreicht werden. Interessanterweise ist bereits bekannt, dass auch Viren, die ebenso wie CpG-A große Mengen an IFN- α induzieren, in Endosomen akkumulieren (Brunetti, Dingwell et al. 1998).

Als Ursache für das unterschiedliche intrazelluläre Transportverhalten und damit auch für die unterschiedliche Potenz bezüglich der IFN- α -Produktion werden strukturelle Charakteristika der CpG-Klassen angesehen. Dabei weist CpG-A als Besonderheiten

einen Poly-G-Schwanz und ein zentrales Palindrom auf (Krug, Rothenfusser et al. 2001). Aufgrund dieser Beschaffenheit formieren sich CpG-A-ODN zu polymeren, übergeordneten Strukturen über die Ausbildung sog. G-Tetraden (Kerkmann, Costa et al. 2005). G-Tetraden bildeten sich dabei unter physiologischen Bedingungen (entsprechend intra- und extrazellulärer Umgebung) aus und erwiesen sich als stabil. Die mikroskopische Analyse ergab als Quartärstruktur Nanopartikel in der Größenordnung von Viren (ca. 20 bis 50 nm). Die Nachahmung der Bildung höhermolekularer Strukturen aus CpG-B-ODN durch Beschichtung von Polystyren-Nanopartikeln führte zur Induktion großer Mengen an IFN- α in der PDC. Eine verstärkte Netto-Aufnahme der höhermolekularen CpG-Strukturen in die Zelle als Ursache der verstärkten IFN- α -Produktion konnte ausgeschlossen werden. Einen möglichen Mechanismus stellt die Vernetzung mehrerer TLR9, sog. *Rezeptor-clustering*, dar (Kerkmann, Costa et al. 2005). Naheliegender erscheint aber aufgrund oben dargestellter Erkenntnisse, dass die Bildung übergeordneter Tertiärstrukturen die Lokalisation des CpG-A/TLR9-Komplexes in bestimmten Kompartimenten innerhalb der Zelle sowie den zeitlichen Ablauf der weiteren Geschehnisse auf eine noch zu klärende Weise beeinflusst.

4.2.1.3 Interferon-priming als Folge des differenzierten räumlich-zeitlichen Ablaufes der Aktivierung durch CpG-A und CpG-B

Als IFN-*priming* wird der Effekt bezeichnet, dass Zellen nach Vorinkubation mit Typ I-IFN auf TLR-Stimulation deutlich größere Mengen an IFN- α produzieren als nach Stimulation ohne vorhergehende Aktivierung (Toth, Endresz et al. 1985; Siren, Pirhonen et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass CpG-B in der PDC nach Vorinkubation mit extrem kleinen Mengen an IFN- β ähnlich große Mengen an IFN- α induziert wie CpG-A (Hornung et al., noch nicht veröffentlichte Daten). Dieser Effekt erwies sich als abhängig von einem funktionierenden IFNAR und ging einher mit einer verstärkten Expression von IRF-7. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Stimulation mit sehr geringen Konzentrationen an CpG-B eine stärkere und in ihrem zeitlichen Ablauf verzögerte IFN- α -Produktion induzierte als hohe Konzentrationen. Eine weitere sehr interessante Beobachtung war, dass eine starke IFN- α -Induktion durch CpG-A erst ab einer gewissen Dichte an kultivierten PDC zu erreichen war.

Die beschriebenen Ergebnisse wurden folgendermaßen interpretiert: Grundlage einer starken IFN- α -Produktion in der PDC ist die TLR9-Aktivierung in mit Typ I-IFN vorstimulierten Zellen; sie stellt damit das Ergebnis des Zusammenspiels direkter TLR-Aktivierung und parakriner Vorinkubation in einer Zellpopulation dar und kann auf der Ebene einer isolierten Zelle höchstens durch externe Zugabe von Typ I-IFN ablaufen.

Durch die schnelle und simultane Aktivierung einer Zellpopulation durch CpG-B (s. z.B. unsere Ergebnisse zur Kinetik der p38-Aktivierung) kann keine Vorstimulation noch nicht aktivierter Zellen durch parakrines IFN ablaufen. Durch den verzögerten und wenig synchronisierten Ablauf der IFN- α -Induktion durch CpG-A (Honda, Ohba et al. 2005) wird diese gegenseitige Beeinflussung der Zellen möglich.

4.2.1.4 *Signalverarbeitung und -weiterleitung über einen zytoplasmatischen Signaltransduktionskomplex*

Während für andere TLR die Vermittlung unterschiedlicher Effekte über einen Rezeptor durch die Rekrutierung verschiedener Adaptermoleküle erklärt werden kann, werden TLR9-Signale ausschließlich über MyD88 vermittelt (Yamamoto, Sato et al. 2003). Es wurde die Existenz eines Signaltransduktionskomplexes beschrieben, eines sog. *cytoplasmic transductional transcriptional processor* (CTTP) (Honda, Yanai et al. 2004). Dieser setzt sich zusammen aus MyD88, IRAK4, Traf6 und IRF-7. Wie ein Prozessor *input* verarbeitet und entsprechenden *output* generiert, sollen hier verschiedene Signale integriert werden und nach Verarbeitung in eine koordinierte Gen-Transkription durch Aktivierung von IRF-7 und NF- κ B münden. Die Vermittlung differenzierter Effekte über den CTTP könnte dabei durch dessen subzelluläre Lokalisation, die zeitliche Abstimmung der Aktivierung oder die Rekrutierung zusätzlicher Komponenten erfolgen. Noch sind die Auswirkungen von CpG-A und CpG-B auf den CTTP unbekannt.

4.2.1.5 *Abhängigkeit der CpG-A- und CpG-B induzierten IFN- α -Produktion von p38*

Die MAP-Kinasen p38, JNK und ERK stellen eine alte Gruppe von Signaltransduktionsmolekülen dar, die an vielen verschiedenen immunologischen Prozessen beteiligt ist (Takeshita, Gursel et al. 2004). Für die Stimulation von TLR9 mit CpG-B-DNA konnte in der B-Zelle die Aktivierung von p38 und JNK gezeigt werden, während ERK unbeeinflusst blieb (Hartmann and Krieg 2000). Die molekularen Ursachen der fehlenden Aktivierung der B-Zelle durch CpG-A sind noch weitgehend unbekannt. Wir konnten zeigen, dass sich diese fehlende Stimulation auch auf Signaltransduktionsebene niederschlug: Weder die MAP-Kinasen p38 und JNK noch I κ B wurden durch CpG-A über Mediumwerte hinaus phosphoryliert, wohingegen CpG-B zur starken Aktivierung führte.

In der PDC konnte gezeigt werden, dass die frühe IFN- α -Induktion durch ein Poly-G-flankiertes CpG-ODN p38-abhängig ist; Inhibition führte zur starken Verminderung von IFN- α , IRF-7 und Stat-Phosphorylierung (Takauji, Iho et al. 2002). Wir konnten

bestätigen, dass CpG-A-induziertes IFN- α p38-abhängig ist, und zusätzlich demonstrieren, dass dies auch für die geringe IFN- α -Produktion durch CpG-B gilt. Neben einer Beteiligung von p38 an der Signaltransduktion von TLR wurde auch seine Rolle in der IFN-induzierten Stat-Phosphorylierung beschrieben (Goh, Haque et al. 1999). Ausgehend von der Annahme, dass CpG-B nur die frühe Phase der IFN- α -Produktion induziert, verweisen unsere Ergebnisse auf eine Rolle von p38 in der frühen Phase der IFN- α -Induktion noch vor Einsetzen des autokrinen feedback loop. JNK und ERK erwiesen sich als unnötig für die IFN- α -Produktion; auch konnten wir durch die simultane Blockierung mehrerer MAP-Kinasen zeigen, dass die Signalvermittlung über p38 erforderlich ist und ein Ausfall auch nicht teilweise durch andere Mitglieder der Familie ausgeglichen werden kann. Im Gegensatz zu den funktionellen Analysen zeigte die direkte Darstellung neben der Aktivierung von p38 auch die Phosphorylierung von ERK durch CpG-A und CpG-B. Der zeitliche Ablauf der Phosphorylierung beider MAP-Kinasen entsprach dabei wieder einer schnell ablaufenden Aktivierung durch CpG-B und der verzögert einsetzenden Aktivierung durch CpG-A.

4.2.1.6 Modulation der CpG-induzierten IFN- α -Produktion durch Nuclear factor- κ B

Neben den MAP-Kinasen stellt NF- κ B eine weitere Familie von konservierten und universell eingesetzten Signaltransduktionsfaktoren dar. Für die TLR9-Stimulation durch CpG-B in B-Zellen wurde bereits die Aktivierung von NF- κ B beschrieben (Hartmann and Krieg 2000); nach Inkubation von B-Zellen mit CpG-A konnten wir eine Phosphorylierung von I κ B ausschließen. Über die Rolle von NF- κ B nach TLR9-Aktivierung durch CpG-ODN in der PDC ist noch wenig bekannt.

Wir konnten eine differenzierte Modulation der CpG-induzierten IFN- α -Produktion belegen: Während CpG-A-induziertes IFN- α durch NF- κ B gefördert wird, hemmt NF- κ B die CpG-B-induzierte IFN- α -Produktion. Das in unseren Experimenten verwendete Peptid SN50 maskiert die nukleäre Translokationssequenz der p50-Untereinheit (Lin, Yao et al. 1995). Damit ist die Aussagekraft beschränkt auf p50-enthaltende NF- κ B-Dimere, also das am häufigsten auftretende stimulatorische Heterodimer p65/p50, sowie das p50-Homodimer. Eine Blockierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten ergab, dass die NF- κ B-Effekte auf die CpG-A-induzierte IFN- α -Produktion zu Beginn der CpG-Stimulation in Kraft treten; die CpG-B-induzierte IFN- α -Produktion kann auch noch durch Blockade wenige Stunden nach Beginn der Stimulation beeinflusst werden. Unsere Ergebnisse identifizieren NF- κ B als Signaltransduktionsmolekül *downstream* des Signaltransduktionskomplexes CTTP, das die durch eine spezifische zeitlich-örtliche Regulation der TLR9-Aktivierung durch CpG-A und CpG-B differenziert

initiierten Signale (Honda, Ohba et al. 2005) weiterleitet und somit zur Vermittlung der unterschiedlichen CpG-Wirkungen beiträgt. Da die Regulation der IFN- α -Produktion in der PDC noch zu einem großen Teil unbekannt ist, kann der Mechanismus der beschriebenen NF- κ B-Effekte nicht zweifelsfrei belegt werden. Es sind jedoch eine Reihe regulatorischer Mechanismen bekannt, die für Erklärungsmodelle herangezogen werden können. Dabei ist grundsätzlich eine indirekte Einflussnahme von NF- κ B über die Induktion von Zytokinen, Regulatoren der Transkription oder bestimmter IRF-Dimere ebenso denkbar wie eine direkte Modulation der NF- κ B-Antwort nach Stimulation mit den verschiedenen CpG-Klassen.

4.2.2 Erklärungsmodelle für die NF- κ B-induzierte Hemmung der IFN- α -Induktion durch CpG-B in der PDC

Inhibierung von CpG-Effekten durch antiinflammatorische Zytokine: Antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 stellen wichtige Faktoren der Gegenregulation nach Aktivierung des Immunsystems durch verschiedene Stimuli dar (Payvandi, Amrute et al. 1998; Moore, de Waal Malefyt et al. 2001). Um eine mögliche Beteiligung von IL-10 an der Hemmung der IFN- α -Produktion durch CpG-B aufzudecken, stimulierten wir PDC in Anwesenheit eines IL-10-blockierenden Antikörpers. Dabei ergaben sich keinerlei Hinweise auf eine Suppression der IFN- α -Produktion durch IL-10.

Suppressor of cytokine signaling: Eine Erklärungsmöglichkeit der geringen IFN- α -Induktion durch CpG-B im Vergleich zu CpG-A stellt die NF- κ B-vermittelte Induktion eines negativen Regulators der TLR-Aktionen dar, beispielsweise durch Vertreter der *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)-Familie. Neben der klassischen Regulation durch SOCS (Gingras, Parganas et al. 2004) existieren auch Daten zu einer direkten SOCS-Induktion durch TLR (Baetz, Frey et al. 2004) und sogar durch CpG-B (Dalpke, Opper et al. 2001). Neben den klassischen Angriffspunkten von SOCS wurde auch eine Inhibition der Stat-Rezeptorbindung belegt (Gisselbrecht 1999), die eine positive Rückkopplung über den IFNAR nach Stimulation mit CpG-B verhindern könnte.

A20: Ein weiteres Enzym mit negativ-regulatorischer Aktivität über den Mechanismus der Deubiquitylierung ist A20 (Boone, Turer et al. 2004; Sun and Chen 2004). Es konnte eine Ubiquitylierung von IRF-7 nach TLR-Aktivierung mit nachfolgender Verstärkung der IFN- α -Produktion gezeigt werden (Kawai, Sato et al. 2004). Eine NF- κ B-vermittelte Induktion von A20 (Krikos, Laherty et al. 1992) nach Stimulation mit CpG-B könnte zu einer Deubiquitylierung von IRF-7 und damit zu einer Verminderung der IFN- α -Produktion führen.

Blimp-1: Blimp-1/PRDI-BF1 ist v.a. als negativer Regulator der IFN- β -Induktion bekannt (Ren, Chee et al. 1999). Es ist aber auch bekannt, dass Blimp-1 mit starker Affinität an IRF-Bindungsstellen mit der Sequenz GAAAG^T/C bindet (Kuo and Calame 2004), zu welcher auch IRF-7 eine hohe Bindungsaffinität aufweist. So könnte NF- κ B-induziertes (Doody, Stephenson et al. 2006) Blimp-1 nach CpG-B-Aktivierung der PDC IRF-7 kompetitiv von seinen Bindungsstellen verdrängen und damit die IFN- α -Produktion abschwächen.

Induktion inhibitorischer IRF-Dimere durch NF- κ B: Es konnte gezeigt werden, dass nicht alle IRF-Dimere stimulatorisch wirken, sondern dass auch inhibitorische Effekte vermittelt werden können (Barnes, Field et al. 2003): So führt die Bildung von IRF-7/IRF-5-Dimeren zur Inhibition der IFN- α -Produktion. Versuche in IRF-5^{-/-} Mäusen zeigten eine ungestörte CpG-A-induzierte IFN- α -Produktion in der PDC (Takaoka, Yanai et al. 2005). IRF-5 könnte also nach CpG-B-Stimulation der PDC durch NF- κ B induziert werden. Durch ein Übergewicht an inhibitorischen IRF-5/IRF-7-Dimeren würde dann die IFN- α -Produktion gehemmt.

Induktion inhibitorischer NF- κ B-Dimere durch CpG-B: Am häufigsten wird die Bezeichnung NF- κ B für das stimulatorische Heterodimer p65/p50 angewandt. Es existieren jedoch auch inhibitorische p50-Homodimere (Ziegler-Heitbrock 2001). Für diese ist eine Stimulus-abhängige hemmende Aktivität beschrieben. Dabei wurde ein Nachlassen der p50-vermittelten Hemmung über die Zeit mit zunehmendem Überwiegen von stimulatorischer p65/p50-Aktivität bei anhaltendem Stimulus beschrieben (Tong, Yin et al. 2004). Ein derartiger Mechanismus könnte durch den unterschiedlichen zeitlichen Ablauf der intrazellulären Aktivitäten von CpG-A und CpG-B getriggert werden. Dabei konnte die Translokation von p50-Dimeren in den Kern von CpG-B aktivierten PDC gezeigt werden (O'Keeffe, Grumont et al. 2005), wo stimulierende Einflüsse von NF- κ B auf die IFN- α -Produktion gehemmt werden könnten.

Rekrutierung von Co-Repressoren nach Stimulation mit CpG-B: Eine weitere Möglichkeit der gegensätzlichen Beeinflussung der Genexpression durch NF- κ B besteht in der Rekrutierung von Co-Aktivatoren bzw. -Repressoren. Dabei wurde stimulatorische Aktivität für NF- κ B in Verbindung mit dem *CREB binding protein* (CBP) gezeigt, während sich die Kooperation mit Histon-Deacetylasen (HDAC) als hemmend erwies (Zhong, May et al. 2002).

4.2.3 Erklärungsmodelle für die NF- κ B-induzierte Förderung der IFN- α -Induktion durch CpG-A in der PDC

Die CpG-A-induzierte IFN- α -Produktion in der PDC wird durch NF- κ B nicht nur nicht gehemmt, sondern sogar verstärkt; diese Verstärkung wird durch einen Rückgang der IFN- α -Induktion durch CpG-A unter NF- κ B-Hemmung deutlich. Aufgrund der bereits beschriebenen Ergebnisse (Hornung et al., noch nicht veröffentlichte Daten) postulieren wir das IFN- α *priming* als entscheidende Voraussetzung für die veränderten Bedingungen nach CpG-A-Stimulation. Es existieren verschiedene potentielle Möglichkeiten, den fördernden Einfluss von NF- κ B auf die CpG-A-induzierte IFN- α -Produktion in der PDC zu erklären:

Synergismus von Stat und NF- κ B: Eine Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren Stat und NF- κ B in der Genregulation ist bekannt (Ganster, Taylor et al. 2001). Diese Interaktion wurde ausführlich für die *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) gezeigt. Ihre Auswirkungen können dabei sowohl hemmender als auch fördernder Natur sein. Nach Stimulation mit CpG-A könnte NF- κ B also synergistisch die Stat-Effekte des positiven *feedback loop* verstärken.

Induktion von IRF-7 durch NF- κ B: Klassischerweise wird IRF-7 durch IFN- α induziert. Sowohl die hohe konstitutive IRF-7-Expression in der PDC als auch die Virus-induzierte IRF-7-Aktivierung wurden jedoch auch als NF- κ B-abhängig beschrieben (Dai, Megjugorac et al. 2004). So könnte auch nach CpG-A-Stimulation NF- κ B die Expression und Aktivierung von IRF-7 fördern.

Direkte IFN- α -Induktion durch NF- κ B: Da NF- κ B-Bindungsstellen in IFN- α -Promotoren analog zur NF- κ B-Bindungsstelle im IFN- β -Promoter nicht beschrieben sind, erscheint eine direkte IFN- α -Induktion durch NF- κ B unwahrscheinlich.

4.2.4 Warum übt NF- κ B je nach Stimulus hemmende oder fördernde Einflüsse auf die IFN- α -Produktion aus?

Für den möglichen molekularen Ablauf der Beeinflussung der IFN- α -Induktion durch NF- κ B wurden zahlreiche potentielle Mechanismen diskutiert. Nun stellt sich die Frage, warum NF- κ B je nach CpG-Klasse hemmende oder fördernde Einflüsse auf die IFN- α -Produktion ausübt. In den vorhergehenden Kapiteln wurde bereits mehrmals die An- oder Abwesenheit des IFN-*priming* als entscheidender Faktor diskutiert. Dabei ergeben sich nun grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten:

- a) NF- κ B induziert nach Stimulation der PDC mit beiden CpG-Klassen sowohl die IFN- α -Produktion hemmende als auch fördernde Mechanismen; welche

Einflüsse sich dabei behaupten, hängt davon ab, ob die PDC durch IFN geprimt wurde oder nicht.

- b) IFN- α -Priming verändert direkt die Bedingungen der ablaufenden Signaltransduktion, so dass NF- κ B einmal hemmende und einmal fördernde Einflüsse vermittelt.

IFN-priming begünstigt die fördernden Einflüsse durch NF- κ B: Geht man vom gleichzeitigen Bestehen hemmender und fördernder Einflüsse von NF- κ B auf die IFN- α -Produktion aus, existieren je nach postuliertem Mechanismus verschiedene Möglichkeiten, dieses Gleichgewicht durch IFN- α zu beeinflussen:

- Die TLR9-vermittelte Induktion der verschiedenen aufgeführten Inhibitoren könnte durch IFN- α supprimiert werden.
- IFN- α -Priming führt zur Aktivierung von IRF-7; das Gleichgewicht aus Expressionslevel, Phosphorylierung und Ubiquitinylierung (Kawai, Sato et al. 2004) könnte dadurch so weit auf die Seite der Aktivierung verschoben sein, dass die A20-vermittelte Inhibition nicht mehr zum Tragen kommt.
- Bei Vermittlung der hemmenden Effekte durch Blimp-1 (Kuo and Calame 2004), könnte durch IFN *priming* aktiviertes IRF-7 den Wettbewerb um IRF-Bindungsstellen mit Blimp-1 zugunsten der IRFs verschieben; nach IFN *priming* wären diese Bindungsstellen dann größtenteils bereits durch IRF-7 besetzt und Blimp-1 könnte nicht mehr negativ regulierend tätig werden.
- Bestimmt das vorherrschende Muster an IRF-Dimeren das Zustandekommen einer starken IFN- α -Produktion, könnte Vorinkubation mit IFN- α das Gleichgewicht aus stimulatorischen und inhibitorischen Dimeren (Barnes, Field et al. 2003) kippen und damit den vollen Effekt der positiven Rückkopplung zur Wirkung kommen lassen.

4.2.5 Zusammenfassung einer Modellvorstellung der unterschiedlichen Wirkmechanismen von CpG-A und CpG-B in der PDC

Im Folgenden soll eine mögliche Modellvorstellung der unterschiedlichen Wirkmechanismen von CpG-A und CpG-B entsprechend den verschiedenen Möglichkeiten, die in den vorausgehenden Kapiteln diskutiert wurden, zusammengefasst werden. CpG-A und CpG-B werden beide in die PDC aufgenommen und gelangen in endosomale Kompartimente; dabei unterscheiden sich Quantität und Kinetik der Aufnahme nicht wesentlich voneinander. Im Endosom binden CpG-A und CpG-B an TLR9, dessen Aktivierung für die Vermittlung der Wirkungen beider CpG-Klassen unerlässlich ist. Aufgrund der unterschiedlichen Quartärstruktur der ODN

werden nun zwei verschiedene Abläufe in Gang gesetzt, die zum einen zu starker Aktivierung und Zytokin-Produktion und zum anderen zur Induktion großer Mengen an IFN- α führen. Nach Bindung von CpG-B an TLR9 kommt es zur raschen Aktivierung und Verlagerung in lysosomale Kompartimente; diese Vorgänge laufen innerhalb einer Zellpopulation relativ synchron ab. Über den CTTTP und unter Beteiligung von p38 wird die frühe Phase der IFN-Produktion initiiert, für die IRF-7 eine entscheidende Rolle spielt. Neben IFN- β wird dabei bereits ein breites Spektrum an IFN- α -Subtypen produziert. Über den CTTTP wird auch NF- κ B aktiviert. Indirekt über die Induktion von Inhibitoren oder durch direkte Interaktion hemmt NF- κ B den IFNAR/Stat-Weg und verhindert damit die Initiierung des positiven *feedback loop* und die Induktion großer Mengen an IFN- α .

Auch CpG-A bindet im Endosom an TLR9; hier laufen aufgrund der Bildung höhermolekularer Strukturen durch CpG-A jedoch Aktivierung und Weitertransport in die Lysosomen deutlich verzögert und innerhalb der Zellpopulation wenig synchronisiert ab. Über den CTTTP und p38 wird die frühe IFN-Produktion getriggert. Dadurch wird ein Teil der Zellen vor abgelaufener TLR-Stimulation mit parakrinem IFN vorstimuliert. Dieses IFN-Priming führt dazu, dass NF- κ B-induzierte Hemm-Mechanismen nicht in Gang gesetzt werden oder ihre Wirkung nicht mehr entfalten können. Im Gegenteil wirkt NF- κ B hier durch positive Beeinflussung des IFNAR/Stat-Weges, beispielsweise durch Synergismus mit Stat, fördernd auf die IFN- α -Produktion. Unter Einsatz des positiven Rückkopplungsmechanismus werden große Mengen an IFN- α - mit einem neuen Muster an IFN- α -Subtypen induziert.

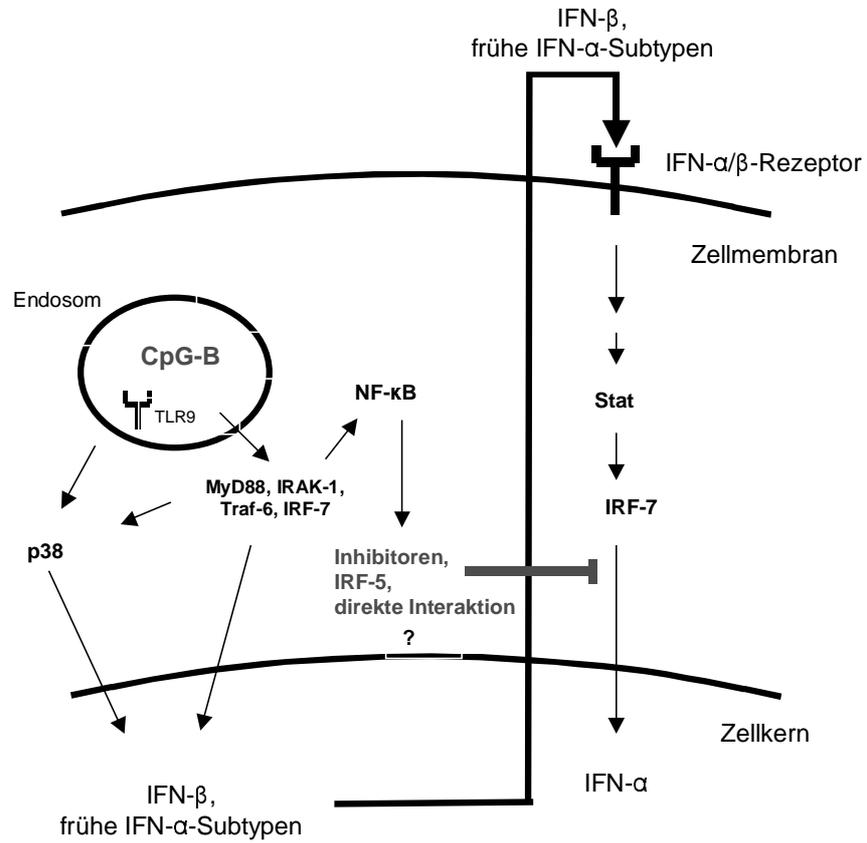


Abb. 25 Modell der IFN-α-Induktion in der PDC durch CpG-B

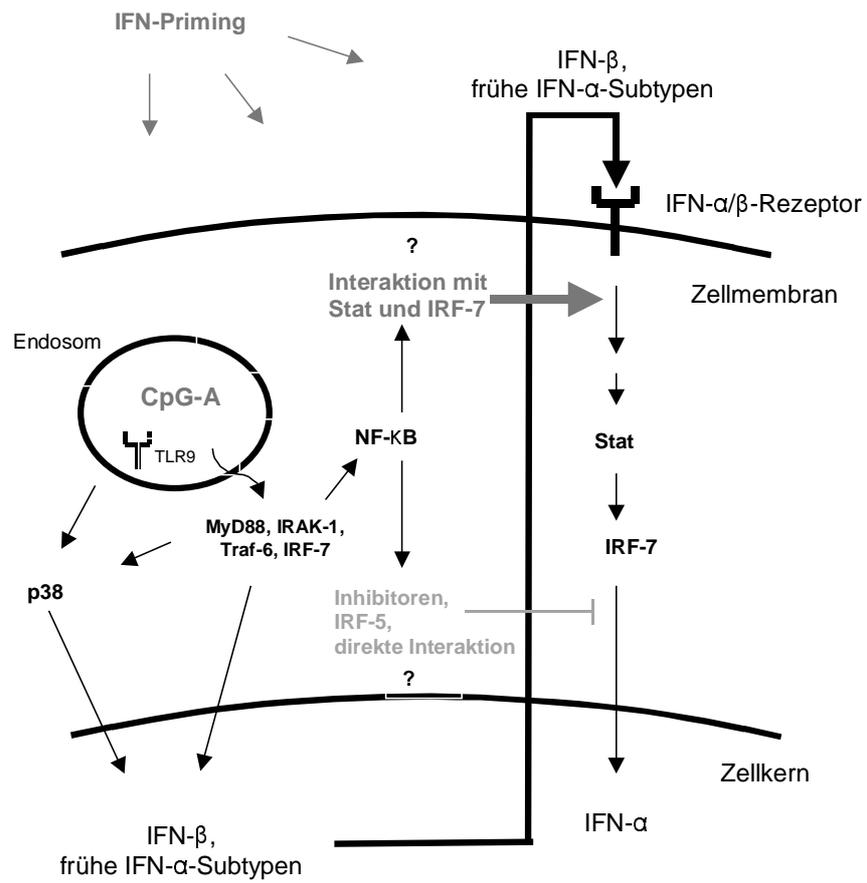


Abb. 26 Modell der IFN-α-Induktion in der PDC durch CpG-A

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mikrobielle DNA, die dem menschlichen Immunsystem als *pathogen-associated molecular pattern* zur Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd dient, kann durch synthetische CpG-Oligonukleotide imitiert werden. Die Erkennung von CpG-ODN wird durch *Toll-like-Rezeptor 9* vermittelt. Dieser wird beim Menschen nur in B-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert. Plasmazytoide dendritische Zellen werden auch als Interferon-produzierende Zellen bezeichnet und stellen bei viralen Infektionen die Hauptquelle an Interferon- α dar. Über diese beiden direkten Zielzellen vermittelt immunstimulatorische DNA eine Vielzahl von Effekten auf das angeborene ebenso wie das adaptive Immunsystem. Mittlerweile sind drei Klassen von CpG-ODN mit unterschiedlichen Wirkungen auf die B-Zelle und die PDC charakterisiert. Während sich CpG-A durch die Induktion großer Mengen an IFN- α in der PDC auszeichnet, führt CpG-B zu einer starken Aktivierung der B-Zelle und der PDC, aber nur zu geringer IFN- α -Induktion. Mit CpG-C wurde eine ODN-Klasse entwickelt, welche die Fähigkeiten zur starken IFN- α -Induktion und effizienten B-Zell-Aktivierung auf sich vereint. CpG-ODN werden in der Immuntherapie von Tumoren, infektiösen und allergischen Erkrankungen sowie als Vakzine-Adjuvans in zahlreichen Studien an Nagern und Primaten und bereits auch am Menschen erprobt. Dabei stellt der gezielte Einsatz der verschiedenen CpG-Klassen eine wichtige Voraussetzung für eine optimale therapeutische Wirksamkeit dar.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war zum einen, die unterschiedlichen Effekte von CpG-A und CpG-B auf die plasmazytoide dendritische Zelle weiter zu charakterisieren und dabei vor allem die Unterschiede in der IFN- α -Produktion nach Stimulation mit CpG-A und CpG-B darzustellen. Den zweiten Schwerpunkt stellte die Untersuchung der aktivierten Signalwege dar; ein besonderer Fokus lag hierbei auf der Frage, ob sich die funktionellen Unterschiede zwischen CpG-A und CpG-B auch auf Signaltransduktionsebene abbilden und durch die Aktivierung verschiedener Signalwege erklären lassen.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die IFN- α -Produktion in der PDC in unterschiedlichen Phasen abläuft. Während CpG-A und CpG-B beide eine frühe Phase der IFN- α -Produktion induzieren, welche bereits ein breites Spektrum an IFN- α -Subtypen aufweist, wird die späte Phase nur durch CpG-A getriggert. Diese zeichnet sich durch ein im Vergleich zur frühen Phase anderes Subtypenmuster und eine verstärkte Stat-Phosphorylierung aus und ist essenziell für die Sekretion großer Mengen an IFN- α . Sowohl die CpG-A- als auch die CpG-B-induzierte IFN- α -Produktion

erweisen sich als abhängig von p38-Aktivierung, wohingegen sie durch JNK- und ERK-Hemmung nicht beeinflusst werden. Im Gegensatz zu den MAP-Kinasen kann für NF- κ B eine gegensätzliche Beeinflussung der IFN- α -Induktion durch CpG-A und CpG-B demonstriert werden: So fördert NF- κ B die CpG-A-induzierte IFN- α -Produktion, während es die CpG-B-induzierte IFN- α -Produktion hemmt. Die beschriebenen Effekte können nur durch eine sofortige bzw. frühzeitige NF- κ B-Hemmung erreicht werden.

Während der Entstehungsphase dieser Dissertation wurden in anderen Projekten der Arbeitsgruppe wichtige neue Erkenntnisse sowohl zur IFN- α -Regulation in der PDC als auch zum Wirkmechanismus der verschiedenen CpG-Klassen gewonnen: Die von uns charakterisierten Phasen der IFN- α -Produktion nach Stimulation mit CpG-A und CpG-B erwiesen sich dabei in anderen Untersuchungen als abhängig von einem positiven autokrinen *feedback loop* und von IRF-7 als wichtigem Regulator. Als Grundlage der verschiedenen Wirkungen von CpG-A und CpG-B konnte ihre unterschiedliche Quartärstruktur und deren Einfluss auf die zeitlich-örtliche Regulation der TLR9-Aktivierung gezeigt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit identifizieren NF- κ B als ein Signaltransduktionsmolekül, das für die Differenzierung der Signale durch CpG-A und CpG-B in der IFN- α -Expression beteiligt ist. Der genaue Mechanismus dieser gegensätzlichen Beeinflussung der CpG-induzierten IFN- α -Produktion ist noch nicht bekannt; seine Aufklärung wird weitere wichtige Erkenntnisse zur IFN- α -Regulation in der PDC und zu den unterschiedlichen Wirkmechanismen von CpG-A und CpG-B liefern.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- (2006). "CpG 7909: PF 3512676, PF-3512676." Drugs R D **7**(5): 312-6.
- Abel, K., Y. Wang, et al. (2005). "Deoxycytidyl-deoxyguanosine oligonucleotide classes A, B, and C induce distinct cytokine gene expression patterns in rhesus monkey peripheral blood mononuclear cells and distinct alpha interferon responses in TLR9-expressing rhesus monkey plasmacytoid dendritic cells." Clin Diagn Lab Immunol **12**(5): 606-21.
- Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, et al. (2002). "Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments." Eur J Immunol **32**(7): 1958-68.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, et al. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-8.
- Aliprantis, A. O., R. B. Yang, et al. (1999). "Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2." Science **285**(5428): 736-9.
- Aliprantis, A. O., R. B. Yang, et al. (2000). "The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2." Embo J **19**(13): 3325-36.
- Anitescu, M., J. H. Chace, et al. (1997). "Interleukin-10 functions in vitro and in vivo to inhibit bacterial DNA-induced secretion of interleukin-12." J Interferon Cytokine Res **17**(12): 781-8.
- Arenzana-Seisdedos, F., P. Turpin, et al. (1997). "Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm." J Cell Sci **110** (Pt 3): 369-78.
- Au, W. C., W. S. Yeow, et al. (2001). "Analysis of functional domains of interferon regulatory factor 7 and its association with IRF-3." Virology **280**(2): 273-82.
- Baetz, A., M. Frey, et al. (2004). "Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells." J Biol Chem **279**(52): 54708-15.
- Ballas, Z. K., A. M. Krieg, et al. (2001). "Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs." J Immunol **167**(9): 4878-86.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Barnes, B. J., A. E. Field, et al. (2003). "Virus-induced heterodimer formation between IRF-5 and IRF-7 modulates assembly of the IFNA enhanceosome in vivo and transcriptional activity of IFNA genes." J Biol Chem **278**(19): 16630-41.
- Barnes, B. J., P. A. Moore, et al. (2001). "Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes." J Biol Chem **276**(26): 23382-90.
- Barton, G. M., J. C. Kagan, et al. (2006). "Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA." Nat Immunol **7**(1): 49-56.
- Barton, G. M. and R. Medzhitov (2002). "Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors." Curr Opin Immunol **14**(3): 380-3.
- Bauer, S., C. J. Kirschning, et al. (2001). "Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9237-42.
- 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.
- Blom, B., S. Ho, et al. (2000). "Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells." J Exp Med **192**(12): 1785-96.

- Boone, D. L., E. E. Turer, et al. (2004). "The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses." Nat Immunol **5**(10): 1052-60.
- Brassard, D. L., M. J. Grace, et al. (2002). "Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein." J Leukoc Biol **71**(4): 565-81.
- Braun, D., I. Caramalho, et al. (2002). "IFN-alpha/beta enhances BCR-dependent B cell responses." Int Immunol **14**(4): 411-9.
- Brunetti, C. R., K. S. Dingwell, et al. (1998). "Herpes simplex virus gD and virions accumulate in endosomes by mannose 6-phosphate-dependent and -independent mechanisms." J Virol **72**(4): 3330-9.
- Carpentier, A. F., J. Xie, et al. (2000). "Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs." Clin Cancer Res **6**(6): 2469-73.
- Cella, M., D. Jarrossay, et al. (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**(8): 919-23.
- Chaplin, D. D. (2006). "1. Overview of the human immune response." J Allergy Clin Immunol **117**(2 Suppl Mini-Primer): S430-5.
- Chawla-Sarkar, M., D. J. Lindner, et al. (2003). "Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis." Apoptosis **8**(3): 237-49.
- Chow, S., H. Patel, et al. (2001). "Measurement of MAP kinase activation by flow cytometry using phospho-specific antibodies to MEK and ERK: potential for pharmacodynamic monitoring of signal transduction inhibitors." Cytometry **46**(2): 72-8.
- Coccia, E. M., M. Severa, et al. (2004). "Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells." Eur J Immunol **34**(3): 796-805.
- Cooper, C. L., H. L. Davis, et al. (2004). "Safety and immunogenicity of CPG 7909 injection as an adjuvant to Fluarix influenza vaccine." Vaccine **22**(23-24): 3136-43.
- Cousens, L. P., R. Peterson, et al. (1999). "Two roads diverged: interferon alpha/beta and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection." J Exp Med **189**(8): 1315-28.
- Dai, J., N. J. Megjugorac, et al. (2004). "Regulation of IFN regulatory factor-7 and IFN-alpha production by enveloped virus and lipopolysaccharide in human plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **173**(3): 1535-48.
- Dalpke, A. H., S. Opper, et al. (2001). "Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs." J Immunol **166**(12): 7082-9.
- Davila, E. and E. Celis (2000). "Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity." J Immunol **165**(1): 539-47.
- Davis, H. L., Suparto, II, et al. (2000). "CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans." Vaccine **18**(18): 1920-4.
- Davis, H. L., R. Weeratna, et al. (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.
- Der, S. D., A. Zhou, et al. (1998). "Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15623-8.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, et al. (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." J Exp Med **193**(2): 233-8.

- DiDonato, J. A., M. Hayakawa, et al. (1997). "A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B." Nature **388**(6642): 548-54.
- Dong, C., R. J. Davis, et al. (2002). "MAP kinases in the immune response." Annu Rev Immunol **20**: 55-72.
- Donnelly, R. P., F. Sheikh, et al. (2004). "The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain." J Leukoc Biol **76**(2): 314-21.
- Doody, G. M., S. Stephenson, et al. (2006). "BLIMP-1 is a target of cellular stress and downstream of the unfolded protein response." Eur J Immunol **36**(6): 1572-1582.
- Gallucci, S. and P. Matzinger (2001). "Danger signals: SOS to the immune system." Curr Opin Immunol **13**(1): 114-9.
- Ganster, R. W., B. S. Taylor, et al. (2001). "Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF- κ B." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8638-43.
- Ghosh, S., M. J. May, et al. (1998). "NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 225-60.
- Gingras, S., E. Parganas, et al. (2004). "Re-examination of the role of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) in the regulation of toll-like receptor signaling." J Biol Chem **279**(52): 54702-7.
- Gisselbrecht, S. (1999). "The CIS/SOCS proteins: a family of cytokine-inducible regulators of signaling." Eur Cytokine Netw **10**(4): 463-70.
- Goh, K. C., S. J. Haque, et al. (1999). "p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons." Embo J **18**(20): 5601-8.
- Greenway, A. L., M. L. Overall, et al. (1992). "Selective production of interferon-alpha subtypes by cultured peripheral blood mononuclear cells and lymphoblastoid cell lines." Immunology **75**(1): 182-8.
- Grouard, G., M. C. Rissoan, et al. (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." J Exp Med **185**(6): 1101-11.
- Gursel, M., D. Verthelyi, et al. (2002). "Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide." J Leukoc Biol **71**(5): 813-20.
- Hacker, H., H. Mischak, et al. (1998). "CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation." Embo J **17**(21): 6230-40.
- Hacker, H., R. M. Vabulas, et al. (2000). "Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6." J Exp Med **192**(4): 595-600.
- Hajjar, A. M., D. S. O'Mahony, et al. (2001). "Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin." J Immunol **166**(1): 15-9.
- Halperin, S. A., S. Dobson, et al. (2006). "Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults." Vaccine **24**(1): 20-6.
- Hartmann, G., J. Battiany, et al. (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. and A. M. Krieg (2000). "Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells." J Immunol **164**(2): 944-53.
- Hashimoto, C., K. L. Hudson, et al. (1988). "The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." Cell **52**(2): 269-79.
- Hayashi, F., K. D. Smith, et al. (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." Nature **410**(6832): 1099-103.

- Heckelsmiller, K., S. Beck, et al. (2002). "Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy." Eur J Immunol **32**(11): 3235-45.
- Heil, F., H. Hemmi, et al. (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." Science **303**(5663): 1526-9.
- Hemmi, H., T. Kaisho, et al. (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, et al. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**(6813): 740-5.
- Hiscott, J., K. Cantell, et al. (1984). "Differential expression of human interferon genes." Nucleic Acids Res **12**(9): 3727-46.
- Honda, K., Y. Ohba, et al. (2005). "Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction." Nature **434**(7036): 1035-40.
- Honda, K., H. Yanai, et al. (2004). "Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(43): 15416-21.
- Honda, K., H. Yanai, et al. (2005). "IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses." Nature **434**(7034): 772-7.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, et al. (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.
- Ishii, K. J., S. Ito, et al. (2005). "CpG-activated Thy1.2+ dendritic cells protect against lethal *Listeria monocytogenes* infection." Eur J Immunol **35**(8): 2397-405.
- Ishii, K. J., F. Takeshita, et al. (2002). "Potential role of phosphatidylinositol 3 kinase, rather than DNA-dependent protein kinase, in CpG DNA-induced immune activation." J Exp Med **196**(2): 269-74.
- Ito, S., K. J. Ishii, et al. (2004). "CpG oligodeoxynucleotides improve the survival of pregnant and fetal mice following *Listeria monocytogenes* infection." Infect Immun **72**(6): 3543-8.
- Ito, T., R. Amakawa, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs." J Immunol **172**(7): 4253-9.
- Izaguirre, A., B. J. Barnes, et al. (2003). "Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells." J Leukoc Biol **74**(6): 1125-38.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Jones, T. R., N. Obaldia, 3rd, et al. (1999). "Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys." Vaccine **17**(23-24): 3065-71.
- Jurk, M., F. Heil, et al. (2002). "Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848." Nat Immunol **3**(6): 499.
- Kadowaki, N., S. Antonenko, et al. (2000). "Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity." J Exp Med **192**(2): 219-26.
- Kadowaki, N., S. Ho, et al. (2001). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens." J Exp Med **194**(6): 863-9.
- Kaisho, T., O. Takeuchi, et al. (2001). "Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells." J Immunol **166**(9): 5688-94.
- Karin, M. and Y. Ben-Neriah (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity." Annu Rev Immunol **18**: 621-63.
- Kawai, T., O. Adachi, et al. (1999). "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." Immunity **11**(1): 115-22.
- Kawai, T., S. Sato, et al. (2004). "Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6." Nat Immunol **5**(10): 1061-8.

- Kawai, T., O. Takeuchi, et al. (2001). "Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes." J Immunol **167**(10): 5887-94.
- Kerkmann, M., L. T. Costa, et al. (2005). "Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells." J Biol Chem **280**(9): 8086-93.
- Kerkmann, M., S. Rothenfusser, et al. (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.
- Klinman, D. M. (2004). "Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides." Nat Rev Immunol **4**(4): 249-58.
- Klinman, D. M., J. Conover, et al. (1999). "Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection." Infect Immun **67**(11): 5658-63.
- Klinman, D. M., K. J. Ishii, et al. (2000). "Immunotherapeutic applications of CpG-containing oligodeoxynucleotides." Drug News Perspect **13**(5): 289-96.
- Kotenko, S. V., G. Gallagher, et al. (2003). "IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex." Nat Immunol **4**(1): 69-77.
- Koyama, T., N. Sakamoto, et al. (2005). "Divergent activities of interferon-alpha subtypes against intracellular hepatitis C virus replication." Hepato Res.
- Krieg, A. M. (2001). "Now I know my CpGs." Trends Microbiol **9**(6): 249-52.
- Krieg, A. M. (2002). "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." Annu Rev Immunol **20**: 709-60.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, et al. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." Nature **374**(6522): 546-9.
- Krikos, A., C. D. Laherty, et al. (1992). "Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements." J Biol Chem **267**(25): 17971-6.
- Krug, A., S. Rothenfusser, et al. (2001). "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, et al. (2003). "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, et al. (2001). "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.
- Kuo, C. C., W. T. Lin, et al. (2006). "Class I and III phosphatidylinositol 3'-kinase play distinct roles in TLR signaling pathway." J Immunol **176**(10): 5943-9.
- Kuo, T. C. and K. L. Calame (2004). "B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp)-1, IFN regulatory factor (IRF)-1, and IRF-2 can bind to the same regulatory sites." J Immunol **173**(9): 5556-63.
- Kurt-Jones, E. A., L. Popova, et al. (2000). "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus." Nat Immunol **1**(5): 398-401.
- Lallena, M. J., M. T. Diaz-Meco, et al. (1999). "Activation of I kappa B kinase beta by protein kinase C isoforms." Mol Cell Biol **19**(3): 2180-8.
- Latz, E., A. Schoenemeyer, et al. (2004). "TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome." Nat Immunol **5**(2): 190-8.
- Le Bon, A., N. Etchart, et al. (2003). "Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon." Nat Immunol **4**(10): 1009-15.
- Le Bon, A., G. Schiavoni, et al. (2001). "Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo." Immunity **14**(4): 461-70.

- Lee, C. K., D. T. Rao, et al. (2000). "Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function." *J Immunol* **165**(7): 3571-7.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* **86**(6): 973-83.
- Lennert, K. and W. Remmele (1958). "[Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes.]" *Acta Haematol* **19**(2): 99-113.
- Levy, D. E., I. Marie, et al. (2002). "Enhancement and diversification of IFN induction by IRF-7-mediated positive feedback." *J Interferon Cytokine Res* **22**(1): 87-93.
- Lin, R., P. Genin, et al. (2000). "Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7." *Mol Cell Biol* **20**(17): 6342-53.
- Lin, X., Y. Mu, et al. (1998). "Molecular determinants of NF-kappaB-inducing kinase action." *Mol Cell Biol* **18**(10): 5899-907.
- Lin, Y. Z., S. Y. Yao, et al. (1995). "Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence." *J Biol Chem* **270**(24): 14255-8.
- Liu, Y. J. (2005). "IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors." *Annu Rev Immunol* **23**: 275-306.
- Loseke, S., E. Grage-Griebenow, et al. (2003). "Differential expression of IFN-alpha subtypes in human PBMC: evaluation of novel real-time PCR assays." *J Immunol Methods* **276**(1-2): 207-22.
- Manzel, L. and D. E. Macfarlane (1999). "Lack of immune stimulation by immobilized CpG-oligodeoxynucleotide." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **9**(5): 459-64.
- Marie, I., J. E. Durbin, et al. (1998). "Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7." *Embo J* **17**(22): 6660-9.
- Marie, I., E. Smith, et al. (2000). "Phosphorylation-induced dimerization of interferon regulatory factor 7 unmasks DNA binding and a bipartite transactivation domain." *Mol Cell Biol* **20**(23): 8803-14.
- Marrack, P., J. Kappler, et al. (1999). "Type I interferons keep activated T cells alive." *J Exp Med* **189**(3): 521-30.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (2000). "How does the immune system distinguish self from nonself?" *Semin Immunol* **12**(3): 185-8; discussion 257-344.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* **388**(6640): 394-7.
- Moldoveanu, Z., L. Love-Homan, et al. (1998). "CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus." *Vaccine* **16**(11-12): 1216-24.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, et al. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annu Rev Immunol* **19**: 683-765.
- Muzio, M., J. Ni, et al. (1997). "IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling." *Science* **278**(5343): 1612-5.
- Nyman, T. A., H. Tolo, et al. (1998). "Identification of nine interferon-alpha subtypes produced by Sendai virus-induced human peripheral blood leucocytes." *Biochem J* **329** (Pt 2): 295-302.
- O'Doherty, U., M. Peng, et al. (1994). "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature." *Immunology* **82**(3): 487-93.
- O'Keeffe, M., R. J. Grumont, et al. (2005). "Distinct roles for the NF-kappaB1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and

- conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals." Blood **106**(10): 3457-64.
- Oshiumi, H., M. Matsumoto, et al. (2003). "TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction." Nat Immunol **4**(2): 161-7.
- Payvandi, F., S. Amrute, et al. (1998). "Exogenous and endogenous IL-10 regulate IFN-alpha production by peripheral blood mononuclear cells in response to viral stimulation." J Immunol **160**(12): 5861-8.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-83.
- Peiser, L., S. Mukhopadhyay, et al. (2002). "Scavenger receptors in innate immunity." Curr Opin Immunol **14**(1): 123-8.
- Penna, G., M. Vulcano, et al. (2002). "Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells." Hum Immunol **63**(12): 1164-71.
- Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-8.
- Prakash, A., E. Smith, et al. (2005). "Tissue-specific positive feedback requirements for production of type I interferon following virus infection." J Biol Chem **280**(19): 18651-7.
- Pyles, R. B., D. Higgins, et al. (2002). "Use of immunostimulatory sequence-containing oligonucleotides as topical therapy for genital herpes simplex virus type 2 infection." J Virol **76**(22): 11387-96.
- Rani, M. R., D. W. Leaman, et al. (1999). "Catalytically active TYK2 is essential for interferon-beta-mediated phosphorylation of STAT3 and interferon-alpha receptor-1 (IFNAR-1) but not for activation of phosphoinositol 3-kinase." J Biol Chem **274**(45): 32507-11.
- Rankin, R., R. Pontarollo, et al. (2001). "CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **11**(5): 333-40.
- Ren, B., K. J. Chee, et al. (1999). "PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins." Genes Dev **13**(1): 125-37.
- Rock, F. L., G. Hardiman, et al. (1998). "A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 588-93.
- Rothenfusser, S., V. Hornung, et al. (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, et al. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG." Hum Immunol **63**(12): 1111-9.
- Salio, M., M. J. Palmowski, et al. (2004). "CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens." J Exp Med **199**(4): 567-79.
- Santeliz, J. V., G. Van Nest, et al. (2002). "Amb a 1-linked CpG oligodeoxynucleotides reverse established airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma." J Allergy Clin Immunol **109**(3): 455-62.
- Sato, M., N. Hata, et al. (1998). "Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7." FEBS Lett **441**(1): 106-10.
- Sen, G. C. (2001). "Viruses and interferons." Annu Rev Microbiol **55**: 255-81.
- Shigematsu, H., B. Reizis, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin." Immunity **21**(1): 43-53.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-7.
- Siren, J., J. Pirhonen, et al. (2005). "IFN-alpha regulates TLR-dependent gene expression of IFN-alpha, IFN-beta, IL-28, and IL-29." J Immunol **174**(4): 1932-7.

- Slutzki, M., D. A. Jaitin, et al. (2006). "Variations in the unstructured C-terminal tail of interferons contribute to differential receptor binding and biological activity." J Mol Biol **360**(5): 1019-30.
- Spits, H., F. Couwenberg, et al. (2000). "Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2." J Exp Med **192**(12): 1775-84.
- Stein, C. A., C. Subasinghe, et al. (1988). "Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides." Nucleic Acids Res **16**(8): 3209-21.
- Sun, L. and Z. J. Chen (2004). "The novel functions of ubiquitination in signaling." Curr Opin Cell Biol **16**(2): 119-26.
- Takaoka, A., H. Yanai, et al. (2005). "Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors." Nature **434**(7030): 243-9.
- Takauji, R., S. Iho, et al. (2002). "CpG-DNA-induced IFN- α production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors." J Leukoc Biol **72**(5): 1011-9.
- Takeda, K., T. Kaisho, et al. (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.
- Takeshita, F., I. Gursel, et al. (2004). "Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9." Semin Immunol **16**(1): 17-22.
- Takeuchi, O., K. Takeda, et al. (2000). "Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades." Int Immunol **12**(1): 113-7.
- Taniguchi, T., K. Ogasawara, et al. (2001). "IRF family of transcription factors as regulators of host defense." Annu Rev Immunol **19**: 623-55.
- Termeer, C., F. Benedix, et al. (2002). "Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4." J Exp Med **195**(1): 99-111.
- Theofilopoulos, A. N., R. Baccala, et al. (2005). "Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity." Annu Rev Immunol **23**: 307-36.
- Tong, X., L. Yin, et al. (2004). "The p50-p50 NF-kappaB complex as a stimulus-specific repressor of gene activation." Mol Cell Biochem **265**(1-2): 171-83.
- Toth, M., V. Endresz, et al. (1985). "Human interferons alpha and beta have more potent priming activities than interferon gamma." J Gen Virol **66 (Pt 4)**: 893-6.
- Underhill, D. M., A. Ozinsky, et al. (1999). "The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens." Nature **401**(6755): 811-5.
- van Ojik, H. H., L. Bevaart, et al. (2003). "CpG-A and B oligodeoxynucleotides enhance the efficacy of antibody therapy by activating different effector cell populations." Cancer Res **63**(17): 5595-600.
- Verthelyi, D., M. Gursel, et al. (2003). "CpG oligodeoxynucleotides protect normal and SIV-infected macaques from Leishmania infection." J Immunol **170**(9): 4717-23.
- Verthelyi, D., R. T. Kenney, et al. (2002). "CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates." J Immunol **168**(4): 1659-63.
- Weiner, G. J., H. M. Liu, et al. (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.
- Whiteside, S. T. and A. Israel (1997). "I kappa B proteins: structure, function and regulation." Semin Cancer Biol **8**(2): 75-82.
- Wooldridge, J. E., Z. Ballas, et al. (1997). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma." Blood **89**(8): 2994-8.
- Wyllie, D. H., E. Kiss-Toth, et al. (2000). "Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses." J Immunol **165**(12): 7125-32.
- Yamamoto, M., S. Sato, et al. (2003). "Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway." Science **301**(5633): 640-3.
- Yamamoto, M., S. Sato, et al. (2002). "Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4." Nature **420**(6913): 324-9.

- Yamamoto, M., S. Sato, et al. (2003). "TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway." Nat Immunol **4**(11): 1144-50.
- Yamamoto, M., S. Sato, et al. (2002). "Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling." J Immunol **169**(12): 6668-72.
- Yao, G. Q., S. Corrias, et al. (1996). "Identification of two oligodeoxyribonucleotide binding proteins on plasma membranes of human cell lines." Biochem Pharmacol **51**(4): 431-6.
- Yeow, W. S., W. C. Au, et al. (2000). "Reconstitution of virus-mediated expression of interferon alpha genes in human fibroblast cells by ectopic interferon regulatory factor-7." J Biol Chem **275**(9): 6313-20.
- Yi, A. K., M. Chang, et al. (1998). "CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry." J Immunol **160**(12): 5898-906.
- Yi, A. K., R. Tuetken, et al. (1998). "CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species." J Immunol **160**(10): 4755-61.
- Yie, J., K. Senger, et al. (1999). "Mechanism by which the IFN-beta enhanceosome activates transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13108-13.
- Zarembek, K. A. and P. J. Godowski (2002). "Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines." J Immunol **168**(2): 554-61.
- Zhong, H., M. J. May, et al. (2002). "The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1." Mol Cell **9**(3): 625-36.
- Ziegler-Heitbrock, L. (2001). "The p50-homodimer mechanism in tolerance to LPS." J Endotoxin Res **7**(3): 219-22.
- Zimmermann, S., O. Egeter, et al. (1998). "CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis." J Immunol **160**(8): 3627-30.

Abkürzungen und Akronyme

APC	Antigen-präsentierende Zelle (S. 20)
ATF	<i>activating transcription factor</i> (S. 15)
BDCA	<i>blood dendritic cell antigen</i> (S. 31)
CBP	<i>CREB binding protein</i> (S. 86)
CD	<i>cluster of differentiation</i> (S. 20)
CpG	Cytosin-phospho-Guanosin (S. 6)
CTTP	<i>cytoplasmic transductional transcriptional processor</i> (S. 82)
DC	dendritische Zelle (S. 14)
DNA	desoxyribonucleic acid (S. 6)
ECSIT	<i>evolutionary conserved signalling intermediate in Toll pathways</i> (S. 10)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (S. 29)
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i> (S. 7)
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (S. 29)
Flt3L	<i>Fms-like tyrosine kinase 3 ligand</i> (S. 24)
IFN	Interferon (S. 9)
IFNAR	IFN- α/β -Rezeptor (S. 15)
Ig	Immunglobulin (S. 18)
IKK	I κ B-Kinase (S. 12)
IL	Interleukin (S. 4)
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i> (S. 86)
IP	<i>IFN-inducible protein</i> (S. 14)
IPC	<i>interferon producing cell</i> (S. 13)
IRAK	IL-1-assoziierte-Kinase (S. 7)
IRF	<i>interferon regulatory factor</i> (S. 9)
ISG	<i>IFN-stimulated gene</i> (S. 17)
ISGF	<i>IFN-stimulated gene factor</i> (S. 17)
ISRE	<i>IFN-stimulated response element</i> (S. 17)
I κ B	Inhibitor- κ B (S. 11)
Jak	Janus Protein Tyrosinkinase (S. 17)
JNK	<i>c-Jun-N-terminal kinase</i> (S. 7)
LPS	Lipopolysaccharid (S. 5)
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i> (S. 34)
MAP	<i>mitogen-activated protein</i> (S. 6)
MDC	myeloide dendritische Zelle (S. 24)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (S. 20)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (S. 14)
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i> (S. 6)
NaCl	Natrium-Chlorid (S. 33)
NES	nukleäre Exportsequenz (S. 12)
NF- κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i> (S. 6)
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle (S. 2)
ODN	Oligodeoxynukleotid (S. 18)
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> (S. 3)
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (S. 19)
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (S. 31)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (S. 40)
PDC	plasmazytoide dendritische Zelle (S. 6)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase (S. 10)
PKC	Protein-Kinase C (S. 13)
PMA	Phorbol-Myristyl-Acetat (S. 30)
PRD	positive regulatorische Domäne (S. 15)

PRR	<i>pattern recognition receptor</i> (S. 3)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (S. 14)
SIGIRR	<i>single immunoglobulin IL-1R-related molecule</i> (S. 10)
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i> (S. 10)
Stat	<i>signal transducer and activator of transcription</i> (S. 17)
TAB	<i>TAK1-binding protein</i> (S. 7)
TAK	<i>transforming growth factor-β (TGF-β)-activated Kinase</i> (S. 7)
TGF	<i>transforming growth factor</i> (S. 7)
TH	<i>T-Helfer</i> (S. 20)
TIR	<i>Toll-/IL-1-Rezeptor</i> (S. 6)
TIRAP	<i>TIR-domain-containing adaptor protein</i> (S. 8)
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i> (S. 4)
TNK	<i>tumor necrosis factor</i> (S. 20)
TOLLIP	<i>Toll-interacting protein</i> (S. 10)
TRAF	<i>TNFR-assoziiertes-Faktor</i> (S. 7)
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i> (S. 8)
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-β</i> (S. 8)
Tyk	<i>Tyrosin-Kinase</i> (S. 17)

Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. S. Endres möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die Möglichkeit, dass ich diese Arbeit in der herausragenden Atmosphäre seiner Abteilung durchführen konnte, sowie für seine herzliche und engagierte persönliche Unterstützung.

Dem Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. G. Hartmann danke ich besonders für die Vermittlung von Spaß am Forschen und der Möglichkeit zur Teilnahme an internationalen Kongressen.

Ganz besonderen Dank möchte ich meinem Betreuer Dr. Simon Rothenfuß zukommen lassen für die hervorragende kontinuierliche Betreuung und die herzliche Arbeitsatmosphäre.

Für die verlässliche Unterstützung und Motivation danke ich auch allen damaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Klinische Pharmakologie, dabei vor allem Rosi Kiefl, Julia Battiany, Margit Günthner-Biller, Miren Kerkmann, Anja Sarris, Moritz Stuplich und Hendrik Poeck.

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen auf Kongressen und in internationalen Fachzeitschriften:

- **Wellisch D.** Rothenfußer S., Kerkmann M., Stuplich M., Poeck H., Söllner J., Endres S., Hartmann G.
Signal transduction induced by CpG-A and CpG-B in plasmacytoid dendritic cells.
American Association of Immunologists, Annual Meeting 2003, Denver, Colorado
- Hartmann E., Wollenberg B., Rothenfußer S., Wagner M., **Wellisch D.**, Mack B., Giese T., Endres S., Hartmann G.
Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer.
Cancer Res. (2003); 63 (19):6478-87
- Poeck H., Wagner M., Battiany J., Rothenfußer S., **Wellisch D.**, Hornung V., Jahrsdorfer B., Giese T., Endres S., Hartmann G.
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 (2004); 103(8):3058-64
- Marschner A., Rothenfußer S., Hornung V., Prell D., Krug A., Kerkmann M., **Wellisch D.**, Poeck H., Greinacher A., Giese T., Endres S., Hartmann G.
CpG ODN enhance antigen-specific NKT cell activation via plasmacytoid dendritic cells.
Eur. J. Immunol. (2005); 35(8):2347-57

Lebenslauf

Daniela Sauter

geb. Wellisch, geboren am 17. Mai 1979 in Kempten/Allgäu

Ausbildung

- 1998 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur), Kempten
- 1998 - 1999 Studium der Anglistik und Geschichtswissenschaften an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- 1999 - 2006 Studium der Medizin an der LMU
- 8/2001 Ärztliche Vorprüfung
 - 3/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 - 3/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 - 4/2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2005 - 2006 Praktisches Jahr
- 4-5/2005 Chirurgische Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität München,
Abschnitt Chirurgie des Praktischen Jahres (zwei Monate)
 - 6-7/2005 Hospital de S.João, Universidade do Porto, Porto, Portugal,
Abschnitt Chirurgie des Praktischen Jahres (zwei Monate)
 - 8-11/2005 Department Innere Medizin, Universitätsspital Basel, Schweiz,
Abschnitt Innere Medizin des Praktischen Jahres
 - 12/2005 - 2/2006 Neurologische Klinik der Universität München,
Abschnitt Neurologie des Praktischen Jahres
- 2002 - 2004 Promotionsstudiengang „Molekulare Medizin“

Stipendien

- 1998 – 2006 Stipendiatin der “Bayerischen Hochbegabtenförderung”
- 2002 – 2006 Stipendiatin der “Studienstiftung des Deutschen Volkes”

Beruf

- seit 8/2006 Assistenzärztin an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III Großhadern, Klinikum der Universität München