

**Identifizierung einer
neuen CpG-Oligonukleotidklasse
und deren Wirkung auf B-Zellen und
plasmazytoide dendritische Zellen**

vorgelegt von

Julia Battiany

aus München

2006

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reinke

**Identifizierung einer
neuen CpG-Oligonukleotidklasse
und deren Wirkung auf B-Zellen und
plasmazytoide dendritische Zellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Battiany

aus München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H.-G. Klobeck
Prof. Dr. med. K. Degitz
Prof. Dr. med. D. Jüngst

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. G. Hartmann

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2006

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	1
I.1. Einführung in das humane Immunsystem	1
I.1.1. Erkennungsstrategien der angeborenen und adaptiven Immunität	1
I.1.2. <i>Toll-like-Rezeptoren</i> als Sensoren der angeborenen Immunität	2
I.1.3. Typ-I-Interferon - ein Effektormechanismus der angeborenen Immunität	4
I.1.4. Dendritische Zellen	6
I.2. CpG-Oligonukleotide	13
I.2.1. Entdeckung der immunstimulatorischen Aktivität von bakterieller DNA	13
I.2.2. Stimulation des Immunsystems durch CpG-DNA	15
I.2.3. Wirkmechanismus auf subzellulärer Ebene	16
I.2.4. Identifizierung eines optimalen CpG-Motivs	17
I.2.5. Einteilung der synthetischen CpG-Oligonukleotide in zwei Klassen	18
I.2.6. Immuntherapeutische Anwendung von CpG-DNA	19
I.3. Die B-Zelle	24
I.3.1. Die Entwicklung der B-Zelle	24
I.3.2. Antigen-spezifische B-Zell-Aktivierung	25
I.3.3. Die Bildung eines folliculären Keimzentrums	26
I.3.4. Terminale Differenzierung der B-Zelle	29
I.4. Nanopartikel als <i>drug-delivery</i>-System für CpG-Oligonukleotide	30
I.4.1. Definition von Nanopartikeln	31
I.4.2. Verteilung von Nanopartikeln im Körper	31
I.4.3. Gelatine als optimales Ausgangsmaterial für Trägersysteme	32
I.4.4. Herstellungsverfahren von Nanopartikeln	33
I.4.5. Anwendung von Nanopartikeln	35
I.5. Fragestellung und Ziel dieser Arbeit	36
II. Material und Methoden	38
II.1. Geräte und Verbrauchsmaterial	38
II.1.1. Geräte	38
II.1.2. Chemikalien und Reagenzien	38
II.1.3. Reagenziensätze	39
II.1.4. Materialien für die Zellkultur	40
II.1.5. Zytokine und Antigene	41
II.1.6. Medien und Puffer für die Zellkultur	41
II.1.7. Antikörper gegen humane Oberflächenmoleküle und Zytokine	42

II.1.8.	Oligodesoxynukleotide (ODN)	43
II.2.	Zellulär - immunologische Methoden	44
II.2.1.	Zellkulturen	44
II.2.2.	Durchflusszytometrie	45
II.2.3.	Aufreinigung von Zellpopulationen	48
II.2.4.	ELISA	52
II.2.5.	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	52
II.2.6.	Beladung der Gelatine-Nanopartikeln	55
III.	Ergebnisse	56
III.1.	Design einer neuen Klasse von CpG-ODN, die sowohl B-Zellen aktivieren als auch simultan große Mengen an IFNα in der PDC induzieren	56
III.1.1.	Aufgereinigte B-Zellen zeigen keine Sensitivität gegenüber den Vertretern der CpG-A-Klasse	56
III.1.2.	Identifizierung von CpG-ODN-Sequenzen, die sowohl aufgereinigte B-Zellen aktivieren als auch gleichzeitig große Mengen an IFN α in der PDC induzieren	58
III.1.3.	Die Aktivierung der B-Zelle mit den neuen CpG-ODN-Sequenzen beruht auf direkten und indirekten Effekten	63
III.1.4.	Aufklärung von Strukturen, die die neuen CpG-ODN ausbilden können	65
III.2.	B-Zell-PDC-Interaktion unter Stimulation mit CpG-C-ODN M362	67
III.2.1.	Die Anwesenheit der PDC verstärkt die Zytokinproduktion unter dem Stimulus CpG-ODN M362 und anti-Ig in beiden B-Zellpopulationen	68
III.2.2.	Die PDC fördert die Plasmazelldifferenzierung sowohl der naiven B-Zelle als auch der B-Gedächtniszelle	69
III.2.3.	Das von der PDC produzierte IFN α beeinflusst die B-Zellaktivierung und -differenzierung	72
III.2.4.	IL-15 als Auslöser eines <i>Isotyp-Switches</i> ?	74
III.3.	Gelatine-Nanopartikel	77
III.3.1.	Beladung von Gelatine-Nanopartikel mit ODN M362 und ODN 2006 verstärkt lediglich einen Arm der immunstimulatorischen Aktivitäten von CpG-ODN	77
IV.	Diskussion	81
IV.1.	Identifizierung einer neuen CpG-Oligonukleotidklasse	81
IV.1.1.	Charakteristische Eigenschaften von CpG-C-Oligonukleotiden	81
IV.1.2.	Vergleich des Prototyps M362 mit Vertretern von CpG-A und CpG-B	84
IV.1.3.	Vergleich mit anderen Vertretern der ODN-Klasse C	87
IV.1.4.	Ableitung einer Struktur-Wirkungsbeziehung	89
IV.1.5.	CpG-C – möglicher therapeutischer Einsatz	91

IV.2.	B-Zell-PDC-Interaktion	94
IV.2.1.	Erhöhte Mengen an IL-6 und IL-10 als Wegweiser für eine verstärkte B-Zelldifferenzierung	94
IV.2.2.	Neuer, T-Lymphozyt-unabhängiger <i>Pathway</i> der Plasmazelldifferenzierung	96
IV.2.3.	IFN α als ein Schlüsselmolekül der B-Zell-PDC-Interaktion	98
IV.2.4.	Neue Funktion der plasmazytoiden dendritischen Zelle in der adaptiven Immunantwort	100
IV.2.5.	Funktion von TLR9 in der B-Zell-PDC-Interaktion	101
IV.2.6.	Auslösung eines CD40L-unabhängigen <i>Isotype-Switch</i> in naiven B-Zellen	103
IV.2.7.	PDC-B-Zell-Interaktion - zum besseren Verständnis des Pathomechanismus des Systemischen Lupus Erythematoses	108
IV.3.	Gelatine-Nanopartikel	111
IV.3.1.	Die strukturelle Beschaffenheit eines CpG-Oligonukleotids ist für eine Komponente der immunstimulatorische Potenz entscheidend	111
IV.3.2.	Liganden-abhängige Rezeptor-Aggregation als Erklärung für die Steigerung der IFN α -Sekretion	112
IV.3.3.	Verstärkte Aufnahme als ein Grund für die gesteigerte IFN α -Sekretion?	114
IV.3.4.	Allein die Sequenz bestimmt den Grad der B-Zellaktivierung	117
IV.3.5.	Vorteile einer Formulierung von immunstimulatorischen CpG-Oligonukleotiden in Anbetracht einer klinischen Anwendung	119
V.	Zusammenfassung	123
VI.	Literatur	128
VII.	Anhang	141
VII.1.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	141
VII.2.	Danksagung	144
VII.3.	Veröffentlichungen	145
VII.4.	Lebenslauf	146

I. Einleitung

I.1. Einführung in das humane Immunsystem

Das Immunsystem wird traditionell in eine angeborene und adaptive Komponente eingeteilt, die unterschiedliche Aufgaben in der Bekämpfung von Krankheitserregern übernehmen. Der adaptive Arm des Immunsystems wird von zwei spezialisierten Zellpopulationen, den T- und B-Lymphozyten, vertreten. Da jeder Lymphozyt einen strukturell einzigartigen Rezeptor auf seiner Oberfläche trägt, ist das Repertoire von Antigenrezeptoren in der gesamten Population der Lymphozyten außerordentlich groß und sehr vielfältig. Die Mannigfaltigkeit dieses Rezeptorrepertoires erhöht die Wahrscheinlichkeit um ein Vielfaches, dass ein Antigen auf seinen spezifischen Lymphozyten trifft. Die Erkennung des spezifischen Antigens löst sowohl eine Aktivierung als auch die Proliferation des entsprechenden Lymphozyten aus. Dieser Prozess, der als klonale Selektion bezeichnet wird, bestimmt einen beträchtlichen Teil der adaptiven Immunabwehr.

Die klonale Expansion der Lymphozyten als Antwort auf eine Infektion ist maßgeblich für die Generierung einer Immunantwort, die schließlich das Pathogen mit größtmöglicher Effizienz eliminiert. Es dauert jedoch 3 bis 5 Tage bis eine ausreichende Zahl an klonal expandierten, antigenspezifischen Lymphozyten erreicht ist und diese zu Effektorzellen differenziert sind. Hier hat die angeborene Immunität die entscheidende Aufgabe, die Infektion in diesen 4 bis 7 Tagen, die bis zum Einsetzen der adaptiven Immunantwort vergehen, in Schach zu halten. Zu den Effektormechanismen der angeborenen Immunität zählen neben der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, die Phagozytose, der alternative *Pathway* des Komplementsystems und die Antigenpräsentation. Die Zellen des angeborenen Immunsystems spielen sowohl bei der sofortigen Beseitigung von Pathogenen als auch bei der Auslösung und der Steuerung von adaptiven Immunreaktionen eine bedeutende Rolle.

I.1.1. Erkennungsstrategien der angeborenen und adaptiven Immunität

Der größte Unterschied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Arm des Immunsystems liegt in den Mechanismen und in den Rezeptoren, die für die Erkennung von Antigenen eingesetzt werden. Im adaptiven Immunsystem ist jede T- und B-Zelle mit einem strukturell einzigartigen Rezeptor ausgestattet, welcher somatisch während der Lymphozytenreifung durch einen Rekombi-

nationsprozess von Genen, die für die Rezeptoren kodieren, nach dem Zufallsprinzip angelegt wird. Da diese Rezeptoren nicht in der Keimbahn kodiert sind, sind sie nicht für die Erkennung eines bestimmten Antigens vorgesehen. Aus dem zufällig generierten Rezeptorreperoire werden im Laufe des Lebens eines Lymphozyten lediglich die „guten und brauchbaren“ Rezeptoren durch positive und negative Selektionsprozesse ausgewählt. Die klonale Expansion der entsprechenden Lymphozyten ist die Folge der Erkennung eines spezifischen Antigens. Obwohl diese Rezeptoren einen Selektionsvorteil darstellen, müssen sie von jeder Generation neu generiert werden, da sie über die Keimbahn nicht weitergegeben werden können.

Im Laufe der Evolution muss sich die angeborene vor der adaptiven Immunabwehr entwickelt haben. Alle mehrzelligen Lebewesen verfügen deshalb über irgendeine Form von angeborener Immunität. Im Gegensatz zur adaptiven Immunität erfolgt der Erkennungsprozess im angeborenen System über Rezeptoren, die in der Keimbahn kodiert sind; somit ist die Spezifität eines jeden Rezeptors genetisch festgelegt. Dies hat den Vorteil, dass die Rezeptoren, die sich unter dem Selektionsdruck der Evolution herausgebildet haben, von Generation zu Generation weitergegeben werden. Die angeborene Immunantwort hat sich hingegen auf wenige, hoch-konservierte Strukturen, die vielen Mikroorganismen gemeinsam sind, spezialisiert [1]. Diese Strukturen werden als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP; *pathogen-associated molecular patterns*) und die dazugehörigen Rezeptoren als *pattern recognition receptors* (PRR) bezeichnet. Obwohl PAMPs strukturell eine sehr heterogenen Gruppe darstellen, besitzen sie doch einige, gemeinsame Eigenschaften [2]: zum einen sind die PAMPs für mikrobielle Pathogene spezifisch und sind im Wirtorganismus nicht zu finden, zum anderen sind die Erkennungsmuster für Pathogene überlebenswichtig und machen einen Teil ihrer Pathogenität aus. Des Weiteren handelt es sich für gewöhnlich um Strukturen, die von vielen Erregern geteilt werden.

1.1.2. Toll-like-Rezeptoren als Sensoren der angeborenen Immunität

Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die in der Keimbahn kodiert sind, unterscheiden sich in vielen wichtigen Punkten von den Antigenrezeptoren der adaptiven Immunität. Die PRRs werden von vielen Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, hauptsächlich von antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert. Alle Rezeptoren einer bestimmten Zellpopulation sind in ihrer Spezifität identisch. Nach Rezeptorstimulation, die dem Wirt eine Infektion signalisiert, sind die Zellen aktiviert, mit Effektormechanismen als bald zu reagieren – im Gegensatz zur zeitlich verzögerten Antwort einer Immunzelle, die der adap-

tiven Komponente des Immunsystems angehört. Zu den PRRs des Vertebraten zählen, neben Lektin- [3] und Scavenger-Rezeptoren [4], die *Toll-like*-Rezeptoren.

Die bisher am besten untersuchten PRRs gehören der Familie der *Toll-like*-Rezeptoren an. Die Entdeckung der Struktur und der Rolle des *Toll*-Rezeptors in der angeborenen Immunität der *Drosophila*-Fliege [5], die Identifikation des ersten strukturhomologen Proteins des *Drosophila*-Toll-Rezeptors im humanen System (hTLR4) durch die Arbeitsgruppe um Janeway [6] sowie die Entdeckung, dass Punktmutationen im TLR4-Gen für die LPS-Hyposensitivität in zwei natürlichen Maus-Mutanten verantwortlich gemacht werden können [7], führten zur Identifizierung von TLR4 als den Erkennungsrezeptor für LPS. Mittlerweile sind zehn humane TLRs beschrieben worden, wobei die natürlichen Liganden für einige dieser Rezeptoren bis *dato* noch nicht identifiziert wurden. Die Liganden sind zumeist mikrobiellen Ursprungs, es gibt jedoch auch Hinweise auf endogene Liganden, die während einer Entzündungsreaktion bedingt durch Zellschädigung und Zellstress freigesetzt werden [8]. Einen Überblick über die TLRs und ihre Liganden gibt Tabelle 1. Durch den Prozess einer Heterodimerisierung von *Toll-like*-Rezeptoren wird das Repertoire an Strukturen, die durch TLRs erkannt werden, zusätzlich erhöht [9].

Tabelle 1 Humane *Toll-like*-Rezeptoren und ihre Liganden (nach [10])

TLR	PAMP	Pathogen	Referenz
TLR1	kooperiert mit TLR2		
TLR2	Lipoproteine	Gram-pos. Bakterien	[11, 12]
	Zymosan	Hefen	[9, 12]
	Lipoarabinomannan (LAM)	Mykobakterien	[13, 14]
	MALP-2	Mykoplasmen	[15, 16]
TLR3	doppelsträngige RNA	Viren	[17]
TLR4	LPS	Gram-neg. Bakterien	[7, 18, 19]
	Protein F	RSV	[20]
	HSP60	Wirt	[21, 22]
	Fibronektin	Wirt	[23]
TLR5	Flagellin		[24]
TLR6	Kooperiert mit TLR2		[25]
TLR7	Guanosin-Analoga, ssRNA		[26]

TLR8	Guanosin-Analoga	nicht bekannt	[27]
TLR9	CpG-Motive	Bakterien, Viren	[28]
TLR10	nicht bekannt	nicht bekannt	

TLR1, 2, 4, 5, 6 sind auf die Erkennung von Liganden spezialisiert, die für Bakterien einzigartig sind und vom infizierten Wirt selbst nicht produziert werden können. Deshalb gewährt ihre Erkennung eine Unterscheidung von Selbst und Fremd. Hingegen sind TLR3, 7, 8, 9 auf die Erkennung viraler Strukturen festgelegt und registrieren Nukleinsäuren, die nicht nur in der mikrobiellen Welt existieren. Hier wird die Differenzierung von Fremd und Eigen nicht über die Natur der Liganden gesteuert, sondern über die Zugänglichkeit des jeweiligen TLRs. Diese TLRs sind in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert [29, 30] und detektieren virale Liganden in späten Endosomen-Lysosomen [31]. Da Nukleinsäuren des Wirts diese Zellkompartimente auf natürlichem Wege nicht erreichen, können sie folglich kein TLR-vermitteltes Signal auslösen.

Die molekularen Mechanismen, über die TLRs die Expression immunrelevanter Gene induzieren, wurden über die Analyse TLR-vermittelter Signaltransduktionswege geklärt. *Toll-like*-Rezeptoren sind evolutionär hoch-konservierte Typ-I-Transmembranproteine, die über einen multiplen Leucinreichen Sequenzabschnitt in der Ektodomäne und einer *Toll*-homologen Domäne im zytoplasmatischen Abschnitt charakterisiert werden. Die intrazytoplasmatische Region, welche für die Signaltransduktion des jeweiligen TLR-Proteins größte Bedeutung hat, wird aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) als *Toll*/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne (TIR) bezeichnet. In den Signalwegen, die durch verschiedene TLRs ausgelöst werden, bestehen einige Unterschiede, aber auch große Übereinstimmungen. Analog dem IL-1R nutzen viele TLRs den *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) als Adaptorprotein, welcher über die Aktivierung von NF- κ B und MAP-Kinasen einen Signalweg induziert, der zu einer inflammatorischen Antwort (TNF α , IL-12) führt. Verschiedene TLRs können jedoch eine unterschiedliche Genexpression in dem gleichen Zelltyp induzieren. Dies ist im Wesentlichen auf die Rekrutierung zusätzlicher (*TIR domain-containing adapter protein*; TIRAP) oder alternativer (*TIR domain-containing adapter inducing IFN-beta*; TRIF) Adaptermoleküle zurückzuführen [32].

1.1.3. Typ-I-Interferon - ein Effektormechanismus der angeborenen Immunität

Interferone (IFN), die erstmals 1957 von Isaacs und seinen Mitarbeitern entdeckt wurden [33], stellen eine Familie von Zytokinen dar, die sowohl in der frühen angeborenen als auch in der Aus-

lösung einer adaptiven Immunantwort eine bedeutende Rolle spielen. Die Bezeichnung Interferon leitet sich von dem Zytokineffekt ab, mit der Virusreplikation in zuvor nicht infizierten Zellen zu „interferieren“.

Zur Typ-I-Interferon-Familie zählen $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$, $\text{IFN}\omega$ und $\text{IFN}\tau$ [34]. Von $\text{IFN}\alpha$ wurden 13 Subtypen identifiziert, während jeweils nur ein einziges Gen für $\text{IFN}\beta$, $\text{IFN}\omega$ und $\text{IFN}\tau$ kodiert. Vor kurzem wurde die Identifizierung von drei weiteren Zytokinen (IL-28A, IL-28B und IL-29) veröffentlicht, die aufgrund ihrer antiviralen Aktivität $\text{IFN}\lambda$ 1-3 bezeichnet wurden [35]. Diese Interferone zeigen zwar nur eine geringe Homologie zu $\text{IFN}\alpha$ und signalisieren über einen abweichenden Rezeptor; jedoch wurden Parallelen zu der Signaltransduktionskaskade von $\text{IFN}\alpha/\beta$ entdeckt [36].

Die Stimulation von Zellpopulationen mit Viren, Bakterien oder synthetischen TLR-Liganden (Poly(I):Poly(C), CpG-Oligonukleotide, Imiquimod) im Rahmen einer Reaktion des angeborenen Immunsystems resultiert unter anderem in der Transkription von $\text{IFN}\alpha/\beta$ -Genen. Die initiale Sekretion von $\text{IFN}\alpha/\beta$ resultiert über einen autokrinen, positiven *feedback loop*, der über IFN -Rezeptoren vermittelt wird, in der Expression von weiteren $\text{IFN}\alpha$ -Genen [37], die Zellen für eine stärkere, angeborene Immunreaktion sensibilisieren.

Obwohl die Aufgabe von Typ-I-Interferonen häufig nur mit einer antiviralen Reaktion assoziiert wird [33], zeigen diese Zytokine auch eine Vielzahl von Effektorfunktionen, die mit der Entwicklung einer adaptiven Immunreaktion, die nicht auf eine antivirale Abwehr beschränkt ist, in Verbindung stehen:

1. Eine verstärkte zytotoxische Aktivität von Makrophagen und NK-Zellen ist über $\text{IFN}\alpha$ erklärbar [38].
2. Die Förderung der Proliferation von CD8^+ -T-Gedächtniszellen; hierbei leistet das durch $\text{IFN}\alpha$ induzierte IL-15 einen entscheidenden Beitrag [39].
3. $\text{IFN}\alpha$ fungiert als Überlebensfaktor von T-Zellen [40].
4. Förderung der Antikörperproduktion und Beteiligung am Immunglobulinklassenwechsel in B-Zellen [41].
5. $\text{IFN}\alpha/\beta$ fördert die Differenzierung, den Reifungsprozess sowie die immunstimulatorische Funktionen von dendritischen Zellen [42].

Neben den direkten zellulären Effekten kann Typ-I-IFN die Expression sowie die Funktion einiger Zytokine beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass IFN α/β und IFN α/β -Induktoren die Expression von IL-15 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in humanen dendritischen Zellen, die aus Monozyten mit GM-CSF und IFN α generiert wurden, hervorrufen können [42]. Im Gegensatz dazu kann die IL-12-Expression in Abhängigkeit der IFN α/β -Konzentration sowohl negativ als auch positiv beeinflusst werden.

1.1.4. Dendritische Zellen

1.1.4.1. Dendritische Zellen verknüpfen angeborene und adaptive Immunreaktionen

Dendritische Zellen (DC) sind eine Zellpopulation mit der Schlüsselfunktion, die Informationen der angeborenen Immunantwort in die „Sprache“, die von Zellen des adaptiven Immunsystems verstanden wird, zu übersetzen. DCs besitzen die angeborene Fähigkeit, Signale einer Infektion zu erkennen, und dienen bei der Aktivierung naiver T-Zellen als antigenpräsentierende Zelle (APC). Diese zwei charakteristischen Eigenschaften der DC werden eng miteinander verknüpft: unreifen DCs fehlt das nötige Werkzeug zur Stimulation naiver T-Zellen, erlangen diese Fähigkeit aber, sobald sie die Präsenz einer Infektion direkt über ihren PRR wahrgenommen haben. Zusätzlich können DCs indirekte Indikatoren einer Infektion, wie die Zytokinausschüttung (z.B. IFN α) anderer infizierter Zellen, detektieren.

Nachdem unreife dendritische Zellen im peripheren Gewebe Krankheitserreger entdeckt und aufgenommen haben, wandern sie zum drainierenden Lymphknoten. Zur Wanderung veranlasst die dendritische Zelle eine verringerte Expression von inflammatorischen Chemokinrezeptoren bei gleichzeitiger Aufregulation der Rezeptoren für lymphoide Chemokine [43]. Nach Ankunft im Lymphknoten ziehen DCs in die Areale des Lymphknotens, die unaufhörlich von T-Zellen durchquert werden, und präsentieren ihnen das prozessierte Antigen in Form von Peptidfragmenten, die an MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche gebunden sind. In diesem Stadium haben die bereits reifen DCs die Fähigkeit verloren, Antigene aufzunehmen und zu prozessieren; stattdessen wird die Antigenpräsentation und die Bereitstellung kostimulatorischer Moleküle zur Hauptaufgabe der reifen DC. Der Reifungsprozess einer dendritischen Zelle, der über TLR-Signale vermittelt wird, stellt somit die Verknüpfung von angeborener und erworbener Immunität dar.

Seltene, antigenspezifische T-Zellen begegnen ihrem Antigen auf der Oberfläche der spezifischen DC, die der T-Zelle zur Auslösung einer Aktivierungskaskade zwei Signale geben muss: Erstens ein antigenspezifisches Signal, das die T-Zelle über die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Peptid-MHC-Klasse-II-Komplex erreicht. Das zweite und über die Auslösung einer adaptiven Immunreaktion entscheidende Signal ist die Bereitstellung der kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf der Zelloberfläche einer dendritischen Zelle und deren Wechselwirkung mit dem T-Zell-Rezeptor CD28.

Da zur Aktivierung naiver T-Zellen gleichzeitig von ein und derselben Zelle antigenspezifische und kostimulierende Signale ausgehen müssen, bedeutet dies, dass T-Zell-Antworten nur von dendritischen Zellen ausgelöst werden können, die bereits durch die Bindung von TLR-Liganden aktiviert wurden [44]. Wenn die Antigenbindung an den T-Zell-Rezeptor ohne Kostimulation erfolgt, bleibt die T-Zelle nicht nur inaktiv, sondern geht in einen anergischen Zustand über [45]. Ist die T-Zelle einmal aktiviert, exprimiert sie eine Vielzahl von Proteinen, die das kostimulierende Signal, welches für die klonale Vermehrung und Differenzierung sorgt, erhalten und modifizieren. Ein solches Molekül ist der CD40-Ligand (CD40L), der an das Oberflächenmolekül CD40 auf der dendritischen Zelle bindet. Diese Bindung übermittelt T-Zellen Aktivierungssignale und veranlasst zudem die DC, kostimulatorische Moleküle zu exprimieren, die die T-Zell-Proliferation wiederum stimulieren.

Naive CD4⁺-T-Zellen können sich nach Aktivierung und Proliferation, die durch die eigene Sekretion von IL-2 verstärkt wird, entweder zu einer TH1- oder TH2-Zelle [46] entwickeln, die jeweils unterschiedliche Zytokine synthetisieren und sich daher in ihren Funktionen unterscheiden. TH1-Zellen sezernieren IFN γ und fördern hauptsächlich eine zellvermittelte Immunantwort. TH2-Zellen hingegen produzieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und unterstützen primär die humorale Immunantwort. Das Zytokinmilieu, das die DC schafft, leistet einen großen und entscheidenden Beitrag zu diesem Differenzierungsschritt: IL-12 begünstigt die Induktion einer TH1-Antwort [47], hingegen fördert IL-4 die Differenzierung zu einer TH2-Zelle (siehe Abb. 1). DCs sind für die Aktivierung von naiven CD8⁺-T-Zellen ebenso wichtig. DCs alleine können die Proliferation von allogenen CD8⁺-T-Zellen *in vitro* stimulieren [48]. Allerdings bedarf es zur Differenzierung einer zytotoxischen T-Zelle der Hilfe von CD4⁺-T-Zellen; hierbei erkennen beiden T-Zellsubpopulationen auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle verwandte Antigene.

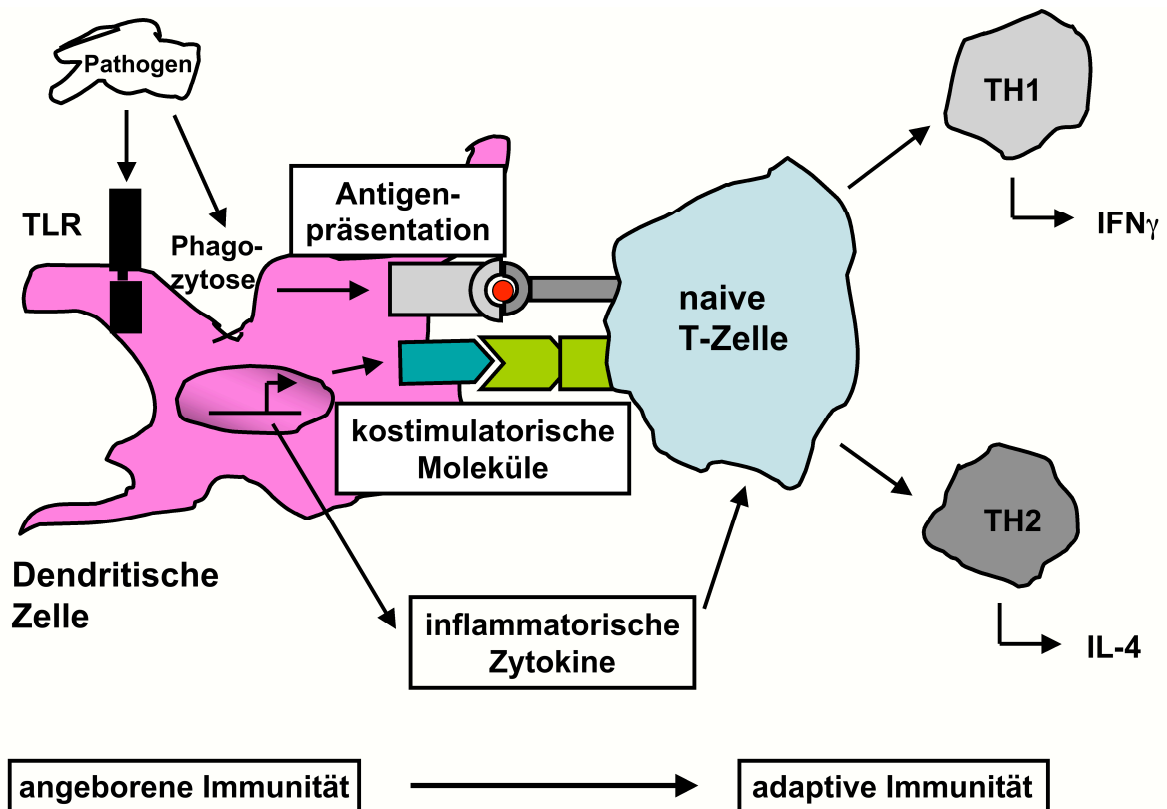


Abbildung 1 Verknüpfung von angeborener und adaptiven Immunität. Dendritische Zellen nehmen Pathogene über Phagozytose auf und präsentieren nach erfolgreicher Antigenprozessierung den naiven T-Zellen Peptidfragmente. Zusätzlich werden über TLRs molekulare Muster, die für Pathogene charakteristisch sind (PAMP), erkannt. Dies führt in der Folge zur Expression kostimulatorischer Moleküle und inflammatorischer Zytokine. Erst die Kombination von Antigenpräsentation und einer TLR-vermittelten Expression von kostimulatorischen Molekülen sowie die Sekretion inflammatorischer Moleküle ermöglicht die Entwicklung einer antigenspezifischen, adaptiven Immunreaktion [nach 49].

Die Induktion der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche der DC ist ein besonders wichtiger Schritt für die Einleitung einer adaptiven Immunantwort. Es ist – wie schon früh von Janeway und Mitarbeiter postuliert wurde - die Verknüpfung von Pathogenerkennung und der Induktion von Kostimulatoren, die eine Aktivierung von Pathogen-spezifischen T-Zellen erlaubt [50].

1.1.4.2. Die plasmazytoide dendritische Zelle

DCs stellen eine Population von Zellen mit großer Heterogenität dar, die sich nach Herkunft und Differenzierungsstadium unterscheiden und über verschiedene Aufgabenfelder charakterisiert werden können. Im humanen System lassen sich phänotypisch zwei verschiedene DC-Subpopulationen des peripheren Blut unterscheiden: die myeloide CD11c⁺ DC (MDC) und die plasmazytoide CD11c⁻ DC (PDC) [51]. Weiterhin wurde gezeigt, dass diese zwei DC-Zellpopulationen unter-

schiedliche Profile an PRRs exprimieren. Dies weist daraufhin, dass sich DCs im Laufe der Evolution auf die Erkennung unterschiedlicher Pathogene spezialisiert haben [52].

Entdeckung der plasmazytoiden dendritischen Zelle

1958 berichteten erstmals die Pathologen K. Lennert und W. Remmele von einer Zelle, die morphologisch große Ähnlichkeit zu einer Plasmazelle hat und sich in den T-Zell-Arealen von humanen, reaktiven Lymphknoten befindet. Sie benannten diese Zelle aufgrund ihres äußeren Erscheinungsbildes und ihres „Wohnortes“ „*T-associated plasma cell*“ [53]. Einige Jahre später erfolgte eine Umbenennung zu „*plasmacytoid T cell*“, da zwar die Expression des Oberflächenmarkers CD4, der zu den charakteristischen Oberflächenmolekülen einer T-Zelle zählt, nachgewiesen werden konnte, die Suche nach einem B-Zell-Antigen oder einem Oberflächenimmunglobulin jedoch fehl schlug [54]. Die Arbeitsgruppe um Facchetti zweifelte die neue Bezeichnung erneut an, da dem „*plasmacytoid T cell*“ die T-Zell-Rezeptorkomponente CD3 auf seiner Oberfläche fehlt, jedoch MHC-II-Moleküle und myeloide Antigene exprimiert werden. Auf diesen Erkenntnissen beruhend erhielt die Zelle den Namen „*plasmacytoid monocyte*“ [55]

1993 wurden bei der Untersuchung humaner Tonsillen zwei Populationen von CD4⁺CD3⁻-Zellen entdeckt: 1. CD4⁺CD3⁻CD11c⁺ dendritische Zellen innerhalb von Keimzentren, die T-Zellen und B-Zellen aktivieren bzw. koaktivieren können [56]. 2. CD4⁺CD3⁻CD11c⁻ Zellen, die sich räumlich auf die T-Zellreichen Areale um die Venole mit hohem Endothel (HEV) beschränken und eine lymphoid-plasmazytoide Morphologie aufzeigen. Sie können in Gegenwart des Überlebensfaktors IL-3 oder einer kombinierten Stimulation mit IL-3 und CD40L zu reifen DCs differenzieren [57]. Bei genauer Betrachtung der gerade beschriebenen CD4⁺CD3⁻CD11c⁻ Zellen im Elektronenmikroskop überraschte die Plasmazell-Morphologie. Man folgerte, dass es sich bei dem „*plasmacytoid monocyte*“, der einst von Dr. Facchetti beschrieben wurde [55], der CD4⁺CD3⁻CD11c⁻ Zellen und bei den von O'Doherty beschriebenen HLA-DR⁺CD11c⁻-Zellen [51] um dieselbe Zelle handeln muss, die fortan plasmazytoide dendritische Zelle (PDC) genannt wurde [57].

Die nächste, zu klärende Frage war die Aufgabe der plasmazytoiden dendritischen Zelle, bevor sie zur antigenpräsentierenden Zelle differenziert. Es existierte der Hinweis, dass die plasmazytoide dendritische Zelle der mysteriösen Interferon-produzierenden Zelle (IPC), die bis dato noch nicht isoliert und vollständig charakterisiert werden konnte, gleicht. Obwohl die meisten Zellpopulationen konstitutiv die Fähigkeit besitzen, als Reaktion auf eine Virusinfektion Typ-I-Interferon zu

sezernieren, bestand übereinstimmende Klarheit darüber, dass ein Hauptproduzent dieses Zytokins existieren muss [58]. Über die sog. IPCs war bekannt, dass ihnen Oberflächenmarker und Eigenschaften von B-, T- und NK-Zellen sowie Monozyten und Makrophagen fehlten [59], allerdings verwunderte schon immer die starke Expression von MHC-II-Molekülen [60]. Dieser Phänotyp führte zu der Annahme, dass IPCs eine DC-Population repräsentieren [61].

1996 wurde von Svensson et al. erneut der Versuch unternommen, den Phänotyp von IFN α -positiven, mononukleären Zellen nach 5-stündiger Stimulation mit Herpes-simplex-Viren (HSV) zu ermitteln [62]. Wegen der großen Übereinstimmungen im Phänotyp von PDC und IPC war nachvollziehbar, dass aufgereinigte PDCs mit der Population der Interferon-produzierenden Zellen deckungsgleich sind [63]. Nahezu gleichzeitig veröffentlichte Cella et al. eine Isolationsmethode von IPCs über die Expression von ILT3 (*immunglobulin-like transcript receptor 3*) und beschrieb zum ersten Mal, dass plasmazytoide dendritische Zellen in infizierten Lymphknoten Typ-I-Interferon *in situ* produzieren [64]. Aus all diesen Beobachtungen konnte folgendes abgeleitet werden: Nach Erkennung eines Pathogens reagiert die IPC als eine Effektorzelle des angeborenen Immunsystems mit der Sekretion von IFN α und differenziert daraufhin zu einer DC, die eine adaptive Immunantwort auslösen kann.

PDCs leiten sich von hämatopoetischen Stammzellen primärer, lymphatischer Gewebe ab [65]. Flt3-Ligand ist ein entscheidender Faktor für diesen Entwicklungsprozess, sowohl im humanen als auch im murinen System [65, 66]. Für die PDC-Mobilisierung aus dem Knochenmark spielt GM-CSF eine bedeutende Rolle [67]. Nach Verlassen des Knochenmarks erreichen PDCs, vergleichbar mit dem Migrationsverhalten von B- und T-Lymphozyten, die T-Zell-reichen Gebiete sekundärer Lymphorgane über die Venole mit hohem Endothel (HEV). PDCs exprimieren CD62L, der mit L-Selektin-Liganden, die von Endothelien exprimiert werden, interagieren kann [68]. Monozyten oder unreife myeloide dendritische Zellen (MDC) hingegen wandern zuerst in nicht-lymphoide Gewebe und machen sich erst im aktivierten Stadium auf den Weg zum drainierenden Lymphknoten.

Pathogensensoren dendritischer Zellen

Während von Monozyten vorzugsweise TLR1, 2, 4, 5, 6 und 8 exprimiert wird, ist bei PDCs lediglich die Expression von TLR7 und 9 nachweisbar [69]. Übereinstimmend mit den beschriebenen Expressionsprofilen reagieren Monozyten auf die bekannten mikrobiellen Liganden wie LPS mit der Produktion von TNF α und IL-6, demgegenüber antworten PDCs mit der Sekretion riesiger

Mengen von IFN α auf ihre Liganden, zu denen zum Beispiel CpG-ODN oder einzelsträngige, virale RNA zählt [69, 70].

PDCs produzieren, wie sonst keine andere Zellpopulation des peripheren Blutes, bei Virusbefall riesige Mengen an IFN α [63]. Nicht alle Klassen von Viren aktivieren PDCs zur IFN α -Produktion und die PDC muss auch nicht selbst vom Virus befallen sein. Des Weiteren reagieren PDCs nicht auf jeden Virus mit der gleichen Intensität. Neueste Beobachtungen zeigen, dass 24 Stunden nach viraler Stimulation PDCs nur noch mäßige Konzentrationen an IFN α produzieren und vor allem bereits aktivierte PDCs gegenüber einer erneuten Stimulation - sowohl mit dem gleichen Virus als auch mit einem neuem Virus - refraktär sind (Kanzler H, Cao W and Liu YJ, *unpublished observation* [80]).

Die Induktion von IL-12 in der PDC wird hingegen in der Literatur kontrovers diskutiert: Nach Stimulation mit HSV oder einem CpG-ODN könnten bei Einsatz frisch isolierter PDCs nur sehr geringe bis nicht detektierbare Mengen an IL-12p70 nachgewiesen werden [71]. Meine Arbeitsgruppe konnte jedoch mit einer Stimulationskombination von CD40L und einem CpG-ODN der Klasse B beträchtliche Mengen von IL-12p70 in der PDC induzieren. In jedem Fall ist die IL-12-Produktion einer PDC an eine verringerte IFN α -Sekretionsfähigkeit gekoppelt [69].

Die PDC als Auslöser einer adaptiven Immunantwort

Im Vergleich zu einer „klassischen“ DC verfügen PDCs über ein geringes Potential, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und auf MHC-Moleküle zu laden. Des Weiteren konnte in Studien, die die gerade genannten Fakten unterstützen, gezeigt werden, dass PDCs nur unzureichend den Prozess der Phagozytose und Mikropinozytose beherrschen [57] und die zwei lysosomalen Proteasen, Cathepsin S und Cathepsin D, die in den Prozessierungsmechanismus eines Antigens involviert sind, nur in vernachlässigbar kleinen Mengen exprimieren [72]. Weiterhin ist von großer Bedeutung, dass isolierte PDCs konstitutiv wenig MHC-II-Moleküle und nahezu nicht detektierbare Mengen an kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Hingegen wird durch eine Aktivierung einer PDC mit einem Pathogen, einem TLR-Ligand oder CD40L ein Reifungsprozess ausgelöst, der das Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle dahingehend verschiebt, dass PDCs eine gesteigerte Kapazität erlangen, mit T-Zellen zu kommunizieren und sie zu aktivieren. Die gesteigerte Expression von MHC-II-Molekülen sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80/86 nach Aktivierung rechtfertigt die Klassifizierung einer PDC als ein Mitglied der DC-Familie. Von einer PDC abgeleitete, reife DCs können die Expansion sowohl von CD8⁺-T-

Gedächtniszellen als auch von TH1-gerichteten CD4⁺-T-Zellpopulationen spezifisch für endogene Antigene [73] und den Influenzavirus [74] induzieren. In der Polarisierung einer T-Zell-Antwort sind PDCs in Abhängigkeit von ihrem Reifungsstadium und der Natur sowie der Konzentration des Antigens flexibel [75]. Virus-aktivierte PDCs lenken vorzugsweise in Richtung einer TH1-Antwort, die T-Zellen zur Produktion großer Mengen an IFN γ oder der beiden Zytokine IFN γ und IL-10 anregt [76]. Eine TH1-Polarisierung, die über reife DCs vermittelt wird, ist von Typ-I-Interferon abhängig [77]. Die über IL-3 und CD40L aktivierten PDCs induzieren eine mäßige TH2-Immunantwort in allogenen T-Zellen, bei der IL-4 keine Beteiligung hat [78].

Die Kommunikation zwischen PDCs und MDCs und die Möglichkeit der PDC, eine produktive, adaptive, T-Zell-vermittelte Immunantwort über die Aktivierung einer MDC zu erzielen, steht im engen Zusammenhang mit dem Vorliegen des Zytokins IFN α . Das von der PDC produzierte IFN α fördert einerseits den Ausreifungsprozess der MDC, andererseits die Aktivierung und die verstärkte Produktion der Zytokine IL-12, IL-15, IL-18 und IL-23 [79].

PDCs haben folglich eine zentrale Position sowohl in der Aktivierung einer angeborenen als auch einer adaptiven Immunantwort. Die Aktivierung der PDC resultiert wiederum in direkten und indirekten Effekten auf viele weitere Zellpopulationen wie Monozyten, MDCs und T-Zellen. Den Einfluss der PDC auf den Differenzierungsprozess von B-Zellen wurde in der hier vorliegenden Arbeit untersucht (siehe Abb. 2).

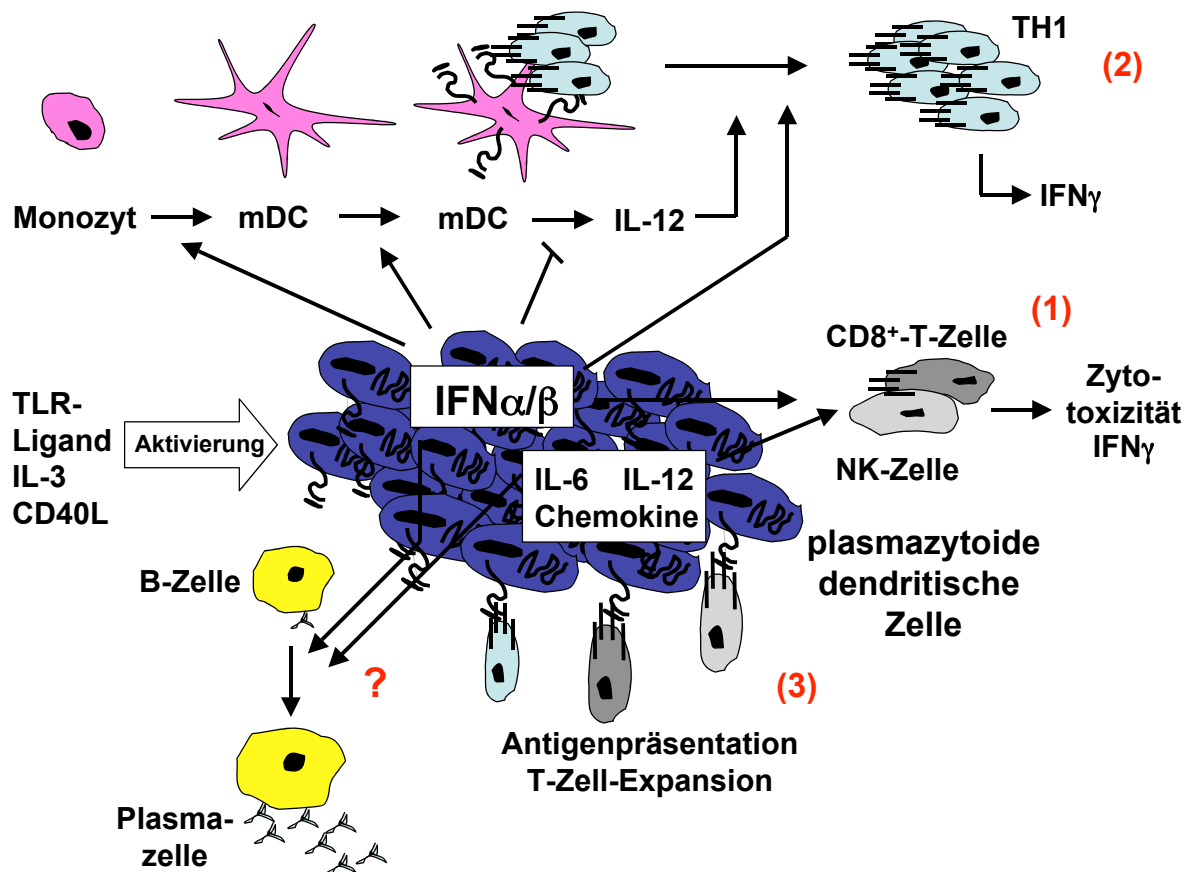


Abbildung 2 Zusammenfassung der immunstimulatorischen Aktivitäten von PDCs. PDCs, die über TLR-Liganden oder CD40L aktiviert wurden, sind potente Induktoren von Typ-I-Interferonen, die in der Folge die Zytotoxizität von NK- und CD8⁺-T-Zellen sowie die Sekretion von IFN γ (1), die Differenzierung und den Reifungsprozess von DCs und eine TH1-Polarisierung von nicht festgelegten, antigenspezifischen CD4⁺-T-Zellen, die nach Aktivierung durch die DC bereits expandierten, fördern (2). Der Einfluss der PDC auf die B-Zelldifferenzierung wird in der hier beschriebenen Arbeit untersucht. Typ-I-IFN reguliert des Weiteren die Sekretion einiger Zytokine (IL-12, IL-6) und Chemokine. Abhängig von den Experimentbedingungen besitzen PDCs auch die Fähigkeit, Antigene zu präsentieren und somit die Expansion von T-Zellpopulationen zu unterstützen (3) [nach 80].

I.2. CpG-Oligonukleotide

I.2.1. Entdeckung der immunstimulatorischen Aktivität von bakterieller DNA

1890 wurde von dem ersten Versuch berichtet, eine nicht-bakterielle Erkrankung mit einer immunstimulatorischen Therapie zu behandeln. Der New Yorker Chirurg William B. Coley setzte bakterielle Lysate aus *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* zur Behandlung von Patienten mit inoperablen Sarkomen ein [81]. Trotz vorübergehender Rückbildung des Tumors und

einer erstaunlichen Heilungsrate von mehr als 10% [82] konnte sich diese Therapieform aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit und der Etablierung anderer, standardisierbarer Verfahren, wie der Strahlentherapie, nicht durchsetzen. Fast 100 Jahre später, als wahrgenommen wurde, dass die Therapie von Tumoren mit konventionellen Behandlungsansätzen ihre Grenzen erreicht hat, wurde erneut ein Versuch gestartet, maligne Neoplasien mit bakteriellen Lysaten von *Mycobacterium bovis* (*Bacille Calmette-Guérin*; BCG) zu therapieren. Der erfolgreiche Ausgang dieses Versuchs machte die lokale Instillation von BCG seit 1976 zu einer Standardtherapie des Harnblasenkarzinoms [83], wobei der genaue Wirkmechanismus unbekannt war.

Die Arbeitsgruppe von Tokunaga et al. beschrieb erstmals, dass die antitumorale Wirkung der BCG-Impfung auf eine Stimulation des Immunsystems zurückzuführen ist [84]. Weitere Untersuchungen führten zu der Schlussfolgerung, dass die bakterielle DNA für die immunstimulatorische Wirkung verantwortlich gemacht werden kann [85]. Folgende strukturelle Voraussetzungen für eine Immunstimulation wurden erarbeitet: das einzelsträngige Oligodeoxynukleotid (ODN) soll über ein zentrales Cytosin-Guanosin-(CG)-Dinukleotid verfügen, das in eine palindromische Sequenz eingebettet ist [85]. Es wurde angenommen, dass die palindromartige Anordnung der Basen der Grund für die Ausbildung von Sekundär- oder Tertiärstrukturen ist; diese sollten dem Vertebratenorganismus als Erkennungsstruktur dienen [86].

Die Arbeitsgruppe um Pisetsky stellte unabhängig von den gerade beschriebenen Ergebnissen eine vergleichbare Hypothese auf. Sie konnten mit aufgereinigter bakterieller DNA und Poly-(dG,dC)-Nukleotiden murine B-Zellen zur Proliferation anregen, stellten jedoch fest, dass DNA von Vertebraten keine immunstimulatorische Aktivität zeigt [87]. Des Weiteren war aufgefallen, dass die stimulatorische Wirkung von Poly-(dG,dC)-Nukleotiden durch eine minimale Modifikation, die Methylierung der Base Cytosin, stark verringert wird. Sie folgerten daraus, dass die Methylierung mit der Ausbildung von sekundären Strukturen interferiert und aufgrund dessen höhere Strukturen der Polynukleotide für die immunstimulatorische Wirkung entscheidend sind [88].

1995 wurde von der Arbeitsgruppe um Arthur M. Krieg die Beobachtung gemacht, dass bestimmte ODN, die bei *antisense*-Versuchen als Kontrolle fungierten, B-Zellen stark zur Proliferation und zur Immunglobulinsekretion aktivieren. Nach der Erprobung einiger hundert ODN-Sequenzen stellte sich heraus, dass als Sequenzelement ein CpG-Dinukleotid in einem bestimmten Basenkontext („XCGY“, wobei X eine beliebige Base ist mit Ausnahme von C, Y irgendeine ausgenommen G) ausreichend ist. Sowohl eine Inversion zu der Basenabfolge GC als auch eine Methylierung des Cytosins hebt die Immunstimulation auf. Es konnte widerlegt werden, dass die

Anordnung der Basen, die das CG-Dinukleotid einschließen, palindromartig sein muss und dass die Ausbildung von höheren Strukturen für die Wirkung entscheidend ist [89].

Diese Erkenntnisse bieten somit eine Erklärungsmöglichkeit, wie es dem Immunsystem von Säugtieren gelingt, zwischen eigener und fremder (=bakterieller) DNA zu differenzieren. Erstens treten CG-Dinukleotide in der bakteriellen DNA mit einer statistisch zu erwartenden Häufigkeit von 1/16 auf, wohingegen CG-Dinukleotide in der vertebraten DNA lediglich mit einer Häufigkeit von 1/60 vorkommen. Zusätzlich zur CpG-Suppression sind CpG-Dinukleotide im vertebraten System zu etwa 70% an der 5'-Position des Cytosins methyliert [90]. Darüber hinaus sind die benachbarten Basen zum CpG-Dinukleotid im vertebraten Genom nicht willkürlich: die Base, die dem CpG vorausgeht, ist in der Mehrzahl der Fälle ein Cytosin, die dem immunstimulatorischen Dinukleotid nachgeschaltete Base meist ein Guanin [91]. Offensichtlich scheint die Erkennung von CpG-Motiven Teil eines Abwehrmechanismus des Vertebratenimmunsystems zu sein, um sich vor dem Eindringen potenziell pathogener Organismen zu schützen.

1.2.2. Stimulation des Immunsystems durch CpG-DNA

Ausgewählte CpG-ODN-Sequenzen sind ein außerordentlich starkes Mitogen für B-Zellen [89]: sie induzieren einen schnellen Übergang in die G1-Phase des Zellzyklus. Des Weiteren reagieren B-Zellen auf CpG-ODN innerhalb weniger Stunden mit der Sekretion von IL-6 und IL-10 [92, 93], die für die weitere Differenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen mitbestimmend sind. Abgesehen von der Induktion zur Zytokin- und Immunglobulinproduktion exprimieren CpG-aktivierte B-Zellen verstärkt folgende Oberflächenmoleküle: die kostimulatorischen Moleküle MHC-Klasse-II, CD80, CD86 [89, 94], wodurch sie ihre Kompetenz als antigenpräsentierende Zelle erlangen, sowie CD40 und CD54 [95]. Die verstärkte Expression von CD40 ist vor allem für die Aktivierung von T-Zellen ausschlaggebend. Neben den aufgezählten stimulatorischen Effekten kann CpG-DNA den Prozess der Apoptose bei primären B-Zellen *in vitro* unterbinden [96].

Die verschiedenen Subpopulationen humaner dendritischer Zellen sind unterschiedlich mit TLRs ausgestattet, um auf verschiedenartigste Pathogene reagieren zu können. Unter den DC-Vorläufern exprimieren nur PDCs große Mengen an TLR9 [97, 98]. Eine direkte Aktivierung der PDC durch CpG-DNA führt zu einer verstärkten Expression der kostimulatorischen Oberflächenmolekülen und zur vermehrten Zytokinsekretion von IL-6 und TNF α . Im Übrigen fördern CpG-ODN das Überleben der PDC *in vitro* und erhöhen die Expression des Reifungsmarkers CD83, der die PDC

zu einem potenten Stimulus allogener T-Zellen macht [99]. Es zeigte sich, dass durch entsprechende CpG-ODN so große Mengen an Typ-I-IFN in PDCs induziert werden, wie sie sonst nur durch eine Virusinfektion ausgelöst werden [100]. Überdies lässt sich durch eine kombinierte Stimulation mit CpG-DNA und einer simultanen CD40-Ligation die Produktion von IL-12, inbegriffen der bioaktiven Form IL-12p70, in PDCs erzielen [99]. Myeloide dendritische Zellen (MDC) hingegen werden nur indirekt innerhalb von PBMCs aktiviert.

Seit den anfänglichen Beobachtungen von Tokunaga, dass mykobakterielle DNA murine NK-Zellen zur Sekretion von IFN γ anregt und zu einer gesteigerten lytischen Aktivität verhilft [101], konnten in vielen weiteren Studien diese ersten Ergebnissen sowohl für die Maus bestätigt werden als auch auf das humane Immunsystem erweitert werden [102]. Die stimulatorischen Effekte von CpG-DNA auf NK-Zellen sind nicht über eine direkte Aktivierung zu erklären. Sekundär erfolgt die Aktivierung über Zytokine, die von CpG-aktivierten, antigenpräsentierenden Zellen (APC) ausgeschüttet werden (IL-12, IFN α/β , TNF α) [103]. Vergleichbare Ergebnisse lieferten Versuche, in denen murine T-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf ihre CpG-Stimulation hin untersucht wurden [104].

1.2.3. Wirkmechanismus auf subzellulärer Ebene

Trotz aussagekräftiger und reproduzierbarer *in vitro*-Daten, die auch vielversprechende *in vivo*-Ergebnisse nach sich zogen, wurde lange Zeit über den molekularen Mechanismus, über den CpG-DNA Immunzellen aktiviert, spekuliert. Die Arbeitsgruppe um Zhao stellte fest, dass die meisten Zellen CpG-DNA an ihrer Oberfläche binden, jedoch diese Bindung sequenzunabhängig erfolgt [105]. Weitere Untersuchungen brachten hervor, dass sich CpG-DNA nach intrazellulärer Aufnahme im endosomalen Kompartiment befindet und seine Wirkung nur nach Azidifizierung des Endosoms entfalten kann [106]. Inhibitoren der endosomalen Azidifizierung wie Chloroquin blockieren den Effekt von CpG-DNA [107]. Bei der Untersuchung der Signaltransduktionskaskade erhielt man erste Hinweise auf einen „CpG-Rezeptor“. Man konnte schließlich nachweisen, dass CpG-DNA über MyD88 und TRAF6 signalisiert und dass folglich ein Rezeptor aus der TLR-Familie mit größter Wahrscheinlichkeit CpG-DNA erkennt [108].

Bei der Auswertung von Untersuchungen mit TLR-*knock-out*-Mäusen fand Hemmi et al. heraus, dass die stimulatorische Kapazität von DNA in TLR9^{-/-}-Mäusen verloren gegangen ist und demzufolge TLR9 für die Erkennung von CpG-DNA einen entscheidenden Beitrag leistet [109]. Diese

Erkenntnisse konnten auf das humane System übertragen werden [110]. Die erstbeschriebenen Ergebnisse zur endosomalen Aufnahme konnten dahingehend bestätigt werden, dass TLR9 im Endosom lokalisiert ist [111]. 2004 konnten der genaue Ort und Ablauf der direkten Bindung von CpG-DNA an TLR9 aufgeklärt werden: CpG-DNA wird über einen Clathrin-abhängigen, endozytotischen *Pathway* internalisiert und gelangt auf diesem Weg ins tubuläre, lysosomale Kompartiment. TLR9 folgt seinem Liganden aus dem endoplasmatischen Retikulum in die CpG-reichen Kompartimente [112].

1.2.4. Identifizierung eines optimalen CpG-Motivs

Aus den Ergebnisse vieler Studien im Mausmodell oder *in vivo* haben sich einige Einsatzmöglichkeiten von CpG-DNA ergeben. Bei dem Versuch der Übertragung auf das humane System hat sich gezeigt, dass die im Mausmodell eingesetzten CpG-ODN nur über eine schwache Wirkung auf humane Immunzellen verfügen. Im Gegensatz zum Menschen, bei dem lediglich zwei Zellpopulationen, B-Zellen und PDCs, direkt von CpG-DNA aktiviert wird, ist die Expression von TLR9 im murinen System über ein breiteres Spektrum von Zellpopulationen verteilt. Hier exprimieren zusätzlich myeloide dendritische Zellen sowie Monozyten TLR9.

Des Weiteren hat sich herausgestellt, dass TLR9 unterschiedlicher Spezies vorzugsweise durch verschiedenartige CpG-Motive aktiviert wird: das optimale humane CpG-Motiv, 5` GTCGTT 3`, wurde von Hartmann et al. anhand der Aktivierung humaner B-Zellen identifiziert [95]. Der murine TLR9 hat hingegen, wie Experimente mit Zelllinien, die mit dem murinen TLR9 ausgestattet waren, ergaben, eine Präferenz für das Hexamer 5` GACGTT 3` [110]. Folglich bestimmt das Rezeptorprotein die Spezies-Spezifität des CpG-Motivs.

Da unmodifizierte Oligonukleotide mit einem Phosphodiester-Rückgrat rasch durch Serum- und zelluläre Nukleasen abgebaut werden, wird bei der Herstellung von CpG-ODN eine chemische Modifikation im „Rückgrat“ vorgenommen. Hierbei wird das nicht an der Bindung beteiligte Sauerstoffatom der Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom ersetzt. Die dabei entstehende Phosphorthioat-Modifikation verhindert den Abbau durch Nukleasen und verlängert somit die Halbwertszeit *in vivo* [113].

1.2.5. Einteilung der synthetischen CpG-Oligonukleotide in zwei Klassen

Als ein Ergebnis der Effekte, die unter **I.2.2** beschrieben wurden, können Oligonukleotide mit unterschiedlichen Rückgraten und Sequenzmotiven Immunreaktionen auslösen, die sowohl in der Quantität als auch in der Qualität der Immunreaktion abweichend ausfallen. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine Einteilung in zwei Hauptklassen von CpG-ODN vorgenommen, die CpG-A und CpG-B (oder Typ D und K [114, 115]) bezeichnet werden. Der bis dato bestehende Pool von ODN wurde primär nach dem biologischen Wirkprofil und nicht nach spezifischen, strukturellen Eigenschaften eingeteilt. Allerdings lassen sich für die jeweiligen CpG-Klassen typische Struktureigenschaften, wie bestimmte Anforderungen an die Sequenz oder an das ODN-Rückgrat, beschreiben [116].

CpG-A (Prototyp ODN 2216) ist in der Lage, PDCs zur Produktion maximaler Mengen an $\text{IFN}\alpha/\beta$ zu stimulieren und indirekt über $\text{IFN}\alpha/\beta$ die lytische Aktivität von NK-Zellen zu fördern. Strukturanalysen der CpG-A-ODN zeigten, dass die Wirkung der $\text{IFN}\alpha$ -induzierenden CpG-ODN von einer zentralen Palindromsequenz, die mindestens ein CG-Dinukleotid enthält, sowie von PolyG-Sequenzen an beiden Enden abhängig ist [100, 117]. Im Vergleich dazu löst CpG-B (Prototyp ODN 2006) ein abweichendes Aktivierungsmuster in der PDC aus. CpG-B fördert das Überleben und induziert eine rasche Ausreifung der PDC, erkennbar an der starken Expression von kostimulatorischen Molekülen und Reifemarkern. Trotz dieser starken Aktivierung stellen CpG-B-ODN nur einen schwachen Stimulus für die Induktion von $\text{IFN}\alpha$ in PDCs dar [100]. Obwohl B-Zellen TLR9 exprimieren, reagieren sie nicht auf CpG-A-ODN. CpG-B stellt jedoch ein starkes Mitogen für die B-Zelle dar, welches sich in einer hohen IL-6-Produktion und einer Aufregulation kostimulatorischer und antigenpräsentierender Moleküle manifestiert [89, 118] (Abb. 3). Ein Ziel dieser Arbeit war unter anderem die Identifizierung neuer CpG-ODN, die die immunstimulatorischen Eigenschaften von CpG-A- und CpG-B-ODN in sich vereinen.

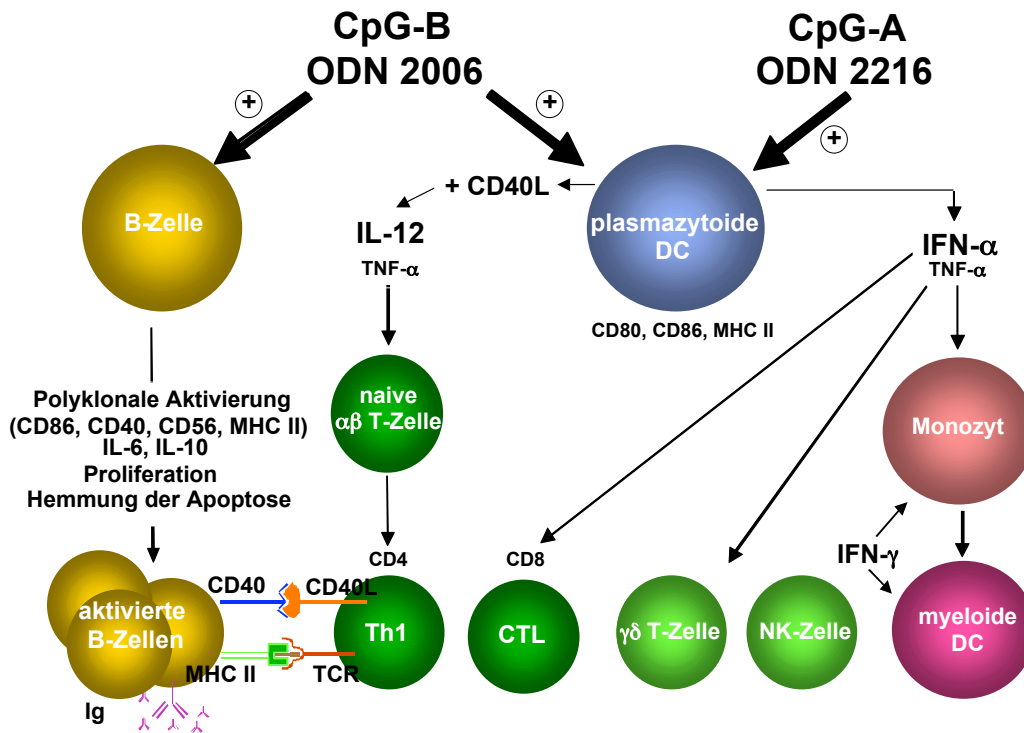


Abbildung 3 Zusammenfassung der Immuneffekte von CpG-A- und CpG-B-ODN [nach 119]. Plasma-zytoide dendritische Zellen (PDC) und B-Zellen werden direkt durch CpG-ODN aktiviert. Andere Immunzellen, wie Monozyten, myeloide dendritische Zellen (MDC), T-Zellen und NK-Zellen werden sekundär über Zytokine vermittelt stimuliert. CpG-A (Prototyp ODN 2216) induziert die Produktion großer Mengen an IFN α in PDCs. Das von der aktivierten PDC sezernierte IFN α induziert die Produktion von IFN γ in NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen. IFN γ zusammen mit dem von PDCs gebildeten IFN α aktiviert sowohl Monozyten als auch myeloide DCs. Des Weiteren verstärkt IFN α die Zytotoxizität von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (CTL). CpG-B (Prototyp ODN 2006) und CD40L stimulieren synergistisch die Produktion von IL-12 in PDC, wodurch das *Primen* naiver α/β -T-Zellen und ihre Differenzierung in Richtung TH1 verstärkt wird. Durch direkte B-Zell-Aktivierung und vermehrte Bildung von TH1-Zellen verstärkt CpG-B die spezifische humorale und zelluläre Immunantwort.

1.2.6. Immuntherapeutische Anwendung von CpG-DNA

Therapeutische Einsatzmöglichkeiten von immunmodulatorischen ODN im Überblick:

1. Auslösung einer angeborenen Immunantwort durch Verabreichung von CpG-ODN dient zum Schutz des Wirtes vor infektiösen Pathogenen.
2. CpG-ODN, die als Adjuvans Vakzinen zugegeben werden, verbessern die Funktion antigenpräsentierender Zellen und fördern somit die Einleitung einer antigenspezifischen, adaptiven Immunantwort.

3. Durch Induktion einer TH1-Antwort wirken CpG-ODN allergischen Reaktionen entgegen, die auf einem *Switch* von TH1 zu TH2 basieren.
4. Die CpG-vermittelte Aktivierung der angeborenen Immunität und das TH1-Zytokinmilieu erlauben den Einsatz in der Immuntherapie von Tumoren.

Immunprotektive Aktivität von CpG-Oligonukleotiden

Um die immunprotektive Eigenschaft von CpG-ODN, die über die Aktivierung einer angeborenen Immunantwort herbeigeführt wird, zu überprüfen, wurde Mäusen vor Injektion pathogener Erreger prophylaktisch bakterielle DNA oder synthetische CpG-ODN verabreicht. Vorbehandelte Tiere waren gegenüber den ursächlichen Bakterien, die Anthrax, Listeriose und Tularämia auslösen [120, 121] und gegen Viren wie den Ebola-, Herpes simplex- und Zytomegalievirus [122, 123] resistent. Gegenüber Parasiten, die für Leishmaniose und Malaria verantwortlich gemacht werden, wurde ebenso eine erhöhte Widerstandsfähigkeit erlangt [124, 125]. Die immunprotektive Aktivität erreichte seinen Höhepunkt wenige Tage nach Verabreichung und blieb über mehrere Wochen bestehen [120, 121]. Der CpG-induzierte Schutz wird neben weiteren Zellpopulationen zu einem großen Anteil über die PDC vermittelt. Mausstämme, die PDC-defizient sind, sind durch die prophylaktische Gabe von CpG-ODN nicht vor Infektionen geschützt [126].

Da ethische Gründe die Durchführung von Studien, die lethale Infektionen hervorrufen, in nicht-humanen Primaten stark einschränken, ist für die Beweisführung der protektiven Aktivität von CpG-DNA, die für den Einsatz am Menschen geplant ist, sehr begrenzt. Studien, die mit Rhesusaffen durchgeführt wurden, geben jedoch erste Hinweise, dass eine Vorbehandlung mit CpG-A die Schwere einer Infektion stark reduziert [127]. Diese Studie eröffnet auch, dass CpG-DNA als Immunadjuvans mit größter Wahrscheinlichkeit im Primaten, wie im Mausmodell vielfach bewiesen, die Induktion eines TH1-Zytokinmilieus hervorrufen kann.

Einsatz als Vakzine-Adjuvans

CpG-DNA fördert erstens die Produktion von Zytokinen/Chemokinen, die eine Umgebung zur Unterstützung einer antigenspezifische Immunantwort schaffen, aktiviert des Weiteren antigenpräsentierende Zellen und löst deren Reifungsprozess aus. Diese Effekte erklären den Einsatz von CpG-ODN als Vakzine-Adjuvans, das die Aufgabe übernimmt, die Immunogenität eines gleichzei-

tig verabreichten Antigens zu erhöhen. Erste Studien, die im Mausmodell durchgeführt wurden, etablierten die Funktion von CpG-ODN in der Steigerung sowohl einer humoralen als auch einer zellulären Immunantwort gegen das Protein Ovalbumin [128]. In weiteren Studien zeigte der Zusatz von CpG-B-ODN zu Vakzinen gegen Influenzaviren, gegen das Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigen oder das Tetanustoxoid antigenspezifische Antikörpertiter, die um ein Vielfaches im Gegensatz zu einer Vakzinierung ohne CpG-Zusatz erhöht waren [129-131]. Übereinstimmend mit der Induktion von TH1-Zytokinen lösen CpG-ODN vorzugsweise die Produktion von IFN γ aus, die die Sekretion von IgG2a-Antikörpern unterstützt und die Entwicklung antigenspezifischer, zytotoxischer T-Zellen ermöglicht [129, 131]. Auch auf das Immunsystem von nicht-humanen Primaten waren die beschriebenen Effekte übertragbar [118]. Eine Studie mit Orang-Utans verursachte besondere Aufmerksamkeit: da Orang-Utans auf eine herkömmliche Hepatitis-B-Vakzine nur mit einer sehr schwachen Immunantwort reagieren, waren die schützenden Antikörpertiter, die eine Vakzine mit CpG-ODN hervorrief, umso erstaunlicher [132]. Dieses Phänomen ist mit der Gabe von CpG-ODN, die immunsupprimierte Wirte vor einer Infektion schützen, vergleichbar.

Prävention und Behandlung von Allergien

Asthma ist eine entzündliche Erkrankung der Atemwege, die von einer gesteigerten Produktion von TH2-Zytokinen, hauptsächlich von IL-4 und IL-5, begleitet wird [133]. Zytokine, die eine TH1-gerichtete-Zellantwort begünstigen, wie IFN γ und IL-12, mindern die Ausprägung der Erkrankung [134, 135]. Beim Einsatz von Hausstaubmilben als Allergen konnte gezeigt werden, dass allergisches Asthma in seiner Ausprägung abgeschwächt oder sogar ausgeheilt werden kann, wenn CpG-ODN als Induktoren einer TH1-Antwort bereits während der Sensibilisierungsphase verabreicht wurden [136]. Überdies zeigt CpG-DNA auch Effekte nach einer Sensibilisierung mit dem entsprechenden Antigen [137]. Eine Behandlung mit CpG-DNA steigert das Verhältnis von IFN γ - zu IL-4-sezernierenden Zellen, reduziert die Anzahl von IgE-produzierenden Plasmazellen und mindert den Einstrom von entzündlichen Zellen in die Lunge [137].

CpG-DNA in der Immuntherapie von Tumoren

Antitumorale Effekte bedingt durch eine Infektionserkrankung werden schon seit vielen Jahren beobachtet. Eine systemische Verabreichung von CpG-ODN als Monotherapie zeigte Effekte in der Bekämpfung von Tumoren, die sich über eine verstärkte NK-Zell-Aktivität erklären lassen. Bei

einem manifesten Tumorbefall im Mausmodell kann eine therapeutische Verabreichung von CpG-DNA eine Regression des Tumorwachstums und bei einer beträchtlichen Anzahl von Tieren sogar eine komplette Remission herbeiführen [138]. Es konnte ein erneuter Tumorbefall nach totaler Remission des ersten Tumors aufgrund der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses verhindert werden [139]. Ausschlaggebend für den Erfolg einer prophylaktischen oder therapeutischen Anwendung von CpG-DNA ist einerseits die Art des Tumors, andererseits die Klasse des eingesetzten CpG-ODN.

Die Stimulierung des angeborenen Immunsystems kann zur Verstärkung der antitumoralen Aktivität auf eine effektivere Weise eingesetzt werden, wenn es in Kombination mit der Verabreichung von monoklonalen Antikörpern (Rituximab, Rituxan®) erfolgt. Ein Effekt eines antitumoralen Antikörpers beruht auf der Antikörper-vermittelten zellgebundenen Zytotoxizität (ADCC), der durch die gleichzeitige Applikation eines ODN stark gefördert werden kann [140].

Obwohl prophylaktische Impfungen gegen Infektionserkrankungen eine positive Auswirkung auf die weltweite Gesundheit zeigen, gestaltet sich die Entwicklung von Vakzinen zur Bekämpfung von Tumoren sehr schwierig. Die größte Herausforderung in der Entwicklung dieser Vakzinen ist der Bedarf, die Immuntoleranz gegenüber einem Antigen zu brechen und eine Tumor-spezifische Immunantwort zu induzieren, die eine zelluläre Immunreaktion von ausreichender Stärke zur Zerstörung von Tumorzellen einschliessen sollte. Als Adjuvans eignet sich CpG-DNA, da es über die Aktivierung von dendritischen Zellen eine TH1-gerichtete Zytokin- und Chemokinumgebung schafft, die ein effektives *cross-priming* von Antigenen fördert und somit eine starke Antwort IFN γ -produzierender, zytotoxischer T-Zellen induziert [141-143].

Sicherheit von CpG-Oligonukleotiden

Einige Bedenken bestehen beim Einsatz von CpG-ODN in klinischen Studien. CpG-ODN könnten neben der angedachten Steigerung der Immunogenität von Fremd-Antigenen auch die von Selbst-Antigenen forcieren und damit die Entwicklung einer organspezifischen oder systemischen Autoimmunerkrankung vorantreiben. Diese Erwägungen werden von Studien untermauert, die zeigten, dass hohe Dosen an bakterieller DNA Auto-Antikörper gegen doppelsträngige DNA in gesunden Mäusen hervorrufen können [144]. Weiterhin stimuliert bakterielle DNA die Produktion von IL-6 und verhindert die Apoptose von aktivierten Lymphozyten, zwei Faktoren, die das Überleben von selbstreaktiven Lymphozyten und somit die Empfänglichkeit für Autoimmunerkrankungen begüns-

tigen [145]. Zu dieser Thematik wurden *in vivo*-Experimente in der Maus unternommen. Nach mehrmaliger Verabreichung von CpG-DNA konnten zwar im Serum DNA-spezifische IgG-Antikörper nachgewiesen werden, deren Menge allerdings nicht ausreichend ist, eine Autoimmunreaktion herbeizuführen oder eine Bestehende zu verstärken [146]. Bei Applikation von CpG-DNA besteht auch die Gefahr der Auslösung eines toxischen Schocks, der über TNF α vermittelt wird. Zur Untersuchung der eventuell bestehenden Toxizität wurde BALB/c-Mäusen wöchentlich über vier Monate hinweg CpG-DNA in Dosen, die denen in Vakzinestudien entsprachen, verabreicht. Alle Tiere blieben gesund und es konnte weder makroskopisch noch mikroskopisch Beweis über eine Gewebeschädigung oder eine Entzündung geführt werden [147]. Klinische Studien am Menschen erbrachten ebenfalls keine Toxizitätsbeweise.

CpG-Oligonukleotide in der Erprobung am Menschen

Die positiven Endpunkte, die man bei Studien mit nicht-humanen Primaten erzielte, ermutigten, CpG-Oligonukleotide auch am Menschen als Adjuvans zu erproben. Es zeichnete sich bei einer veröffentlichten Doppeltblind-Studie ab, dass sich bei gleichzeitiger Verabreichung von Engerix B® (patentierter Hepatitis-B-Impfstoff) und einem CpG-ODN höhere IgG-Antikörpertiter (um das 13- bis 45-fache) sowohl nach primärer als auch nach sekundärer Immunisierung im Vergleich zur alleinigen Gabe der Vakzine einstellten [148]. Bei einer weiteren klinischen Erprobung in Kombination mit der Influenza-Vakzine Fluarix® (SmithKline Beecham) konnte die humorale Immunantwort durch die Zugabe von CpG-B-ODN 7909 nur bei bereits „geprimten“ Probanden signifikant gesteigert werden. Allerdings resultierte die zusätzliche Verabreichung von ODN 7909 in einer gesteigerten Sekretion von IFN γ innerhalb von PBMCs. Die gesteigerte zelluläre Immunreaktion in Anwesenheit des CpG-ODN ermöglicht somit den Einsatz einer reduzierten Vakzinedosis bei gleichbleibender Immunogenität [149]. Bei beiden Studien zeichneten sich neben den beeindruckenden immunstimulatorischen Effekten von CpG-ODN keine bedenklichen unerwünschten Wirkungen ab und keiner der Probanden entwickelte Anzeichen oder Symptome einer Autoimmunreaktion [150].

I.3. Die B-Zelle

B-Zellen sind eine wichtige Komponente des adaptiven Immunsystems. Sie produzieren und sezernieren Millionen von verschiedenen Antikörpern, die unterschiedliche Antigene zu erkennen vermögen. Die Tatsache, dass das humane Immunsystem über ein riesiges Repertoire von Antikörpern verfügt, beruht auf dem komplexen Mechanismus der V(D)J-Rekombination von Immunglobulin(Ig)-Genen und auf Prozessen wie der somatischen Hypermutation und dem Ig-Klassenwechsel (*Isotype-switch*). Der B-Zell-Rezeptor (BCR), der als spezifischer Antigenrezeptor fungiert, ist ein membrangebundener Protein-Komplex. Er setzt sich aus dem antigenbindenden Oberflächenimmunglobulin, das aus zwei schweren (*heavy*; H) Ig-Ketten und zwei leichten (*light*; L) Ketten, die über Disulfidbrücken verknüpft sind, besteht, und aus zwei membrandurchlaufenden und die Signaltransduktion auslösenden Heterodimeren $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ zusammen. Zur Eliminierung von Fremd-Antigenen kooperieren B-Zellen mit dendritischen Zellen und T-Zellen.

I.3.1. Die Entwicklung der B-Zelle

Das Leben eines B-Lymphozyten kann in zwei Phasen gegliedert werden. Der erste Abschnitt, auch B-Lymphopoese genannt, findet in der fetalen Leber statt, bei Erwachsenen im Knochenmark. Es erlaubt die Reifung einer hämatopoetischen, multipotenten Stammzelle zu einer naiven B-Zelle mit einem funktionellen, antigenspezifischen B-Zell-Rezeptor (BCR). Die verschiedenen Stadien der B-Zellentwicklung sind durch aufeinander folgende Schritte der Umlagerung von Antigenrezeptor-Gensegmente an den verschiedenen Genloci und durch die unterschiedliche Expression von bestimmten Zelloberflächenproteinen gekennzeichnet. Dieser Prozess läuft unabhängig von der Anwesenheit einer T-Zelle oder einem Antigen ab.

Der zweite Lebensabschnitt einer B-Zelle wird mit der Antigenbindung über den B-Zell-Rezeptor eingeleitet. Die Antigenbindung induziert die Aktivierung einer B-Zelle, eine starke Proliferation und einen Reifungsprozess, der in der Bildung einer B-Gedächtniszelle mündet oder effiziente antikörpersezernierenden Plasmazellen hervorbringt. Dieser Prozess wird als Immunopoese bezeichnet und erfolgt hauptsächlich in den sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten, der Milz, den Peyerschen Plaques und den Tonsillen [151, 152].

Das erste Stadium der B-Zell-Linie, die Pro-B-Zelle, ist eine Vorläuferzelle, die nur eine begrenzte Kapazität zur Selbsterneuerung besitzt. Sie leitet sich von pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen ab und wird anhand von für dieses Stadium charakteristischen Oberflächenmolekülen identifiziert. In Pro-B-Zellen erfolgt eine Genumordnung des Locus für die schwere Immunglobulinkette. Eine produktive Genumordnung führt zur Expression einer intakten schweren H μ -Kette (positive Selektion), die der Zelle signalisiert, zu überleben und zum nächsten Entwicklungsschritt überzugehen sowie das nachfolgende Entwicklungsstadium, das Prä-B-Zell-Stadium, definiert. Dieses Stadium ist von der Umordnung für die leichte Kette des Ig gekennzeichnet. Sobald ein Gen für die leichte Kette zusammengestellt und ein vollständiges IgM-Molekül auf der Zelloberfläche exprimiert wird, gilt die Zelle als unreife B-Zelle. Kommt es zu keiner produktiven Umordnung, geht die sich entwickelnde B-Zelle zugrunde.

Unreife B-Zellen werden in der Folge zur Reduktion von Autoimmunreaktionen auf ihre Selbsttoleranz hin selektiert (negative Selektion) [153] und in der Folge, ob sie in den peripheren Lymphgeweben überleben können. Sobald die unreife B-Zelle diese Hürden überwunden hat, folgen weitere Differenzierungsschritte. Es entstehen reife B-Zellen, die zusätzlich zu IgM IgD auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Diese Zellen werden auch naive B-Zellen bezeichnet, bis sie auf ihr spezifisches Antigen im peripheren lymphatischen Gewebe treffen und dadurch aktiviert werden. Während der Entwicklung von Pro-B-Zelle zur naiven B-Zelle werden neben den Immunglobuline noch andere, für jedes Stadium typische Proteine, wie die Tyrosinphosphatase CD45R und CD19, exprimiert [151, 152, 154].

1.3.2. Antigen-spezifische B-Zell-Aktivierung

Nachdem die Entwicklung zur naiven B-Zelle im Knochenmark abgeschlossen ist, wandern die B-Zellen über eine Venole mit hohem Endothel (HEV) in sekundäre lymphatische Organe und halten sich dort hauptsächlich in den T-Zell-reichen parakortikalen Bereichen auf. In einer T-Zell-abhängigen, humoralen Immunantwort treffen B-Zellen auf ihr Antigen, das über den spezifischen B-Zell-Rezeptor erkannt wird. B-Zellen sind als einzigste Zellpopulation befähigt, lösliche Antigene des Extrazellulärbereichs zu erkennen. Der B-Zell-Rezeptor hat bei der Aktivierung der B-Zelle zwei Funktionen: erstens sendet er ein Signal direkt ins Zellinnere, sobald ein Antigen gebunden hat, zweitens schleust der B-Zell-Rezeptor das Antigen ins Zellinnere, wo es abgebaut wird und als ein an MHC-Klasse-II-Molekül gebundenes Peptid zur B-Zell-Oberfläche zurückkehrt [155]. Das prozessierte und auf der Oberfläche präsentierte Antigen kann nun von antigenspezifischen T-Zellen erkannt werden. Das spezifische Erkennen des Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexes auf der

B-Zelle sorgt dafür, dass die T-Zelle sowohl zellgebundene als auch sezernierte Effektormoleküle, unter anderem die Zytokine IL-2, IL-4 und IL-5 [156], synthetisiert, die bei der B-Zell-Aktivierung zusammenwirken. Bei den direkten, interzellulären Kontakten hat die Interaktion CD40-CD40L große Bedeutung. Wird sie *in vitro* mit löslichem CD40 oder einem monoklonalem Antikörper gegen CD40L unterbunden, kann die B-Zelle auf T-Zell-Signale nicht mehr reagieren [157].

Zusätzlich zu der beschriebenen B-Zell-T-Zell-Interaktion konnte auch der direkte Einfluss von dendritischen Zellen auf die B-Zelldifferenzierung, der hauptsächlich über IL-12 vermittelt wird, beobachtet werden [158]. Man vermutet eine Art Triade aus DC, antigenspezifischer T-Zelle und B-Zelle, die sich gegenseitig beeinflussen und eine anschließende Immunreaktion steigern: antigenpräsentierende DCs aktivieren, wie oben bereits beschrieben, T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor und CD28, was die Sekretion von IL-2 und die Expression von CD40L nach sich zieht. Im Gegenzug stimulieren aktivierte T-Zellen B-Zellen und dendritische Zellen. Die Ligation von CD40 auf der B-Zelle fördert deren Proliferation, eine CD-40-aktivierte DC induziert die Sekretion von IL-12 und eine vermehrte Sekretion von sgp80 IL-6-Rezeptor α -Kette [159], die wiederum die B-Zelle zur Differenzierung anregen.

An der Grenze zwischen dem T- und B-Zell-Bereich im lymphatischen Gewebe bildet sich ein primärer Focus der B-Zell-Aktivierung aus. Hier proliferieren beide Zellpopulationen einige Tage. Viele der im Focus enthaltenen Lymphozyten durchlaufen eine Apoptose, doch einige der proliferierenden B-Zellen differenzieren zu kurzlebigen, antikörperbildenden Plasmazellen und wandern zu den Marksträngen des Lymphknotens [160]. Die von diesen Plasmazellen sezernierten Antikörper, die vorwiegend einen IgM-Isotyp haben, weisen nur eine geringe Affinität zum Antigen auf, stellen jedoch die erste Antwort auf ein Antigen dar und bieten dem infizierten Individuum sofortigen Schutz.

1.3.3. Die Bildung eines folliculären Keimzentrums

Einige B- und T-Zellen, die sich im Primärfocus vermehrt haben, wandern in den primären Lymphfollikel, indem sie weiter proliferieren und schließlich ein Keimzentrum (GC) bilden [161]. Die primären Follikel enthalten ruhende B-Zellen, die sich um ein Netzwerk von Zellfortsätzen herum anordnen, die von einem spezialisierten Zelltyp, den folliculären dendritischen Zellen (FDC) ausgehen; diese Zellen sezernieren ein Chemokin, das aktivierte B-Zellen in die Follikel lockt.

Zentral im Follikel bildet sich ein Keimzentrum, das sich im Lichtmikroskop gut abgrenzbar in zwei unterschiedliche Kompartimente gliedert: 1. die dunkle Zone, die dicht gepackt viele, große B-Zellen (Centroblasten) enthält, von denen sich die meisten im Zellzyklus befinden, 2. die helle Zone, wo B-Zellen (Centrozyten) kleiner und weniger dicht gedrängt sind; in diesem Bereich haben sich vermehrt folliculäre dendritische Zellen angesammelt [161]. Die rasch proliferierenden Centroblasten sind unter anderem über eine reduzierte Expression des Oberflächenimmunglobulins, vor allem IgD, charakterisiert, während Centrozyten ein normales Ig-Expressionsmuster zeigen [162]. Follikel, in denen sich Keimzentren gebildet haben, nennt man sekundäre Follikel.

Die stark proliferierenden B-Zellen durchlaufen in den Keimzentren eine Reihe wichtiger Modifikationen, die zur Vielfalt der Immunglobuline beitragen:

1. Somatische Hypermutation [163]

Dieser Prozess führt in die variablen Regionen der umgeordneten Gene für die schweren und leichten Immunglobulinketten Punktmutationen ein, durch die jeweils nur eine einzige Aminosäure geändert wird. Die mutierten B-Zell-Rezeptoren der Centroblasten entscheiden darüber, ob der Zelle ein günstiges oder ein ungünstiges Schicksal (programmierter Zelltod) beschieden ist.

2. Affinitätsreifung

Einige der durch den Prozess der somatischen Hypermutation entstandenen Immunglobulinmoleküle binden das entsprechende Antigen besser als die ursprünglichen B-Zell-Rezeptoren. Die B-Zellen, die diesen Antikörper exprimieren, werden positiv selektioniert [164]. Sich wiederholende Zyklen von Proliferation, somatischer Hypermutation und Apoptose im Keimzentrum resultiert in der Selektion von B-Zellen, die Antikörper mit höchster Affinität sezernieren können.

3. Isotypenwechsel [165]

Ein Immunglobulin-Klassenwechsel erlaubt den selektionierten B-Zellen in der hellen Zone des Keimzentrums, in Form von Antikörpern unterschiedlicher Isotypen eine Vielzahl von Effektorfunktionen zu exprimieren. Dieser Prozess läuft nahezu gleichzeitig, aber unabhängig von der somatischen Mutation ab.

Die selektierten B-Zellen differenzieren entweder zu B-Gedächtniszellen oder zu Plasmazellen, die Antikörper mit höherer Affinität und einem anderen Isotypen produzieren können.

Immunglobulin-Klassenwechsel (*isotype switch*)

Da die Auslösung eines Immunglobulin-Klassenwechsels unter anderem Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, möchte ich diesen Prozess detaillierter erläutern. Die Spezifität einer Antikörperreaktion beruht auf der Antigenbindungsstelle, die sich aus den beiden variablen Domänen V_H und V_L zusammensetzt. Welche Effektorfunktion der Antikörper hat, hängt dagegen vom Isotyp der konstanten (C) Region der schweren Kette des Immunglobulins ab. Durch einen Isotypwechsel kann eine bestimmte variable Domäne der schweren Kette mit der konstanten Region eines beliebigen Isotyps assoziiert werden. Der Klassenwechsel wird durch eine ortsspezifische DNA-Rekombination hervorgerufen, die *class switch recombination* (CSR) bezeichnet wird. Dieser Prozess erfolgt zwischen den hintereinander geschalteten, sich wiederholenden *Switch* (S)-Regionen, die am 5'-Ende des jeweiligen C_H -Genes lokalisiert sind [165]. Das Enzym AID (*activation-induced deaminase*) ist maßgeblich an diesem Prozess beteiligt und Mutationen dieses Enzyms sind an der Entstehung des Hyper-IgM-Syndroms beteiligt [166]. Die DNA-Umordnungen, die dem *Isotype Switch* zugrunde liegen, werden von Zytokinen und darunter besonders von denjenigen gesteuert, die von T-Zellen freigesetzt werden. Zytokine induzieren den Wechsel, indem sie die Bildung und das Spleißen von mRNA stimulieren. Unterschiedliche Zytokine lösen bevorzugt einen Wechsel zu einem bestimmten Isotypen aus.

Als erster Antikörper wird grundsätzlich IgM gebildet, der in der Regel nur eine geringe Affinität besitzt, da die produzierende B-Zelle noch keine somatische Hypermutation durchlaufen hat. IgM-Moleküle bilden Pentamere mit 10 Antigenbindungsstellen, die alle gleichzeitig mit einem multiplen Antigen interagieren und somit die geringe Affinität mit insgesamt einer hohen Avidität ausgleichen können. Die dominierende Effektorfunktion von IgM ist die Aktivierung des Komplementsystems. Die Antikörper des Isotyps IgG sind kleiner und können im Gegenteil zu IgM leicht vom Blut ins Gewebe diffundieren. Die meisten B-Zellen, die diesen Isotypen exprimieren, wurden im Keimzentrum im Hinblick auf die erhöhte Affinität für die Bindung ihres Antigens selektiert. IgG opsoniert effizient Pathogene für die Aufnahme durch Makrophagen und aktiviert das Komplementsystem.

1.3.4. Terminale Differenzierung der B-Zelle

Einige überlebende Zellen verlassen das Keimzentrum als Plasmablast und differenzieren erst nach einigen Zellteilungen zur Plasmazelle. Die letztendlich ausdifferenzierte Plasmazelle wandert zum größten Teil ins Knochenmark [167], wo eine Untergruppe von ihnen mehrere Monate ohne Antigenkontakt aufgrund von Signalen der Stromazellen, vor allem IL-6, überleben kann [168]. Die im Knochenmark verweilenden Plasmazellen sezernieren über Monate Antikörper und sind des Öfteren Teil einer sekundären Immunantwort, trotz fehlender Reaktion auf eine erneute Antigenstimulation [167].

Plasmazellen tragen folgende charakteristischen Oberflächenproteine: das Proteoglykan Syndecan-1 (CD138), das extrazelluläre Wachstumsfaktoren erkennt [169], und CD38 [170]. Hingegen fehlen MHC-II-Klasse-Moleküle auf der Oberfläche von Plasmazellen, da sie keine Signale mehr von T-Zellen erhalten. Die Expression des Chemokins CXCR4, das CXCL12 erkennt, welches im Knochenmark gegenwärtig ist, wird sehr hoch [171]. Die Änderung des Chemokinexpressionsmusters weist der Plasmazelle den Weg vom Follikel zum Knochenmark.

Die Biologie von B-Gedächtniszellen ist und bleibt mysteriös. Über B-Gedächtniszellen ist nur wenig bekannt: sie haben eine lange Überlebenszeit, sogar in Abwesenheit des spezifischen Antigens [172], und haben für diese Lebensphase die Fähigkeit verloren, Antikörper zu produzieren [173]. Bei erneutem Kontakt mit dem spezifischen Antigen, beginnt die B-Gedächtniszelle schnell klonal zu expandieren; dabei werden 8-10x so viele Plasmazellen wie bei der primären Immunreaktion generiert [173].

Die Entscheidung über das Schicksal einer B-Zelle nach der GC-Reaktion ist von vielen, teilweise auch noch unbekanntem Faktoren abhängig. Es ist bewiesen, dass B-Zellen mit hochaffinen B-Zell-Rezeptoren meist zu Plasmazellen differenzieren [174]. CD40-Signale begünstigen den Phänotyp einer B-Gedächtniszelle, während andere Rezeptoren aus der TNF-Familie, wie OX40L, eher die Differenzierung zur Plasmazelle fördern [175]. Auch Zytokine haben einen entscheidenden Einfluss; IL-10 zum Beispiel unterbindet die Expansion von B-Gedächtniszellen und treibt die Entwicklung zur Plasmazelle voran [176].

I.4. Nanopartikel als *drug-delivery*-System für CpG-Oligonukleotide

Ein großes Ziel in der Entwicklung neuer Arzneistoffträger (*drug-delivery*-Systeme) ist es, meist sehr potente Arzneistoffe nach Möglichkeit mit höchster Effizienz und größter Sicherheit an ihren Bestimmungsort zu befördern. Dem neuesten Stand von Wissenschaft und Technik zu Folge wurden große Fortschritte in der Entwicklung von immer präziseren *drug-delivery*-Systemen gemacht, die zum größten Teil auf den Einsatz neuer Trägerstoffe zurückzuführen sind. Über folgende Vorteile verfügen *drug delivery*-Systeme [177]:

1. Kontinuierliche Aufrechterhaltung der erforderlichen Arzneistoffkonzentration innerhalb der gewünschten therapeutischen Breite.
2. Reduktion unerwünschter Arzneimittelwirkungen angesichts einer gezielten Ansteuerung ausgewählter Zellpopulationen oder Gewebetypen.
3. Bemerkenswerte Reduktion der benötigten Arzneistoffmenge bei einem gleichbleibenden, therapeutischen Effekt.
4. Verbesserte *compliance* des Patienten aufgrund eines verlängerten zeitlichen Abstandes zwischen den einzelnen Arzneimittelgaben und/oder weniger invasive Verabreichungsmöglichkeiten.
5. Möglichkeit der Verabreichung von Wirkstoffen mit kurzen Halbwertszeiten *in vivo* (Nukleinsäuren).

Zu den vielversprechende, partikulären *drug-delivery*-Systemen zählen neben Nanopartikeln, die hier näher betrachtet werden, Liposomen und Mikropartikel, die sich über abweichende Größen und/oder Ausgangsmaterialien (Phospholipide) definieren. Aus der Vielzahl von unterschiedlichen Nanopartikel-Klassen erscheinen insbesondere die Partikel, die auf Basis von natürlichen Makromolekülen, wie Gelatine oder Albumin, hergestellt werden, Erfolg versprechend. Sie bieten den Vorteil, unter physiologischen Bedingungen nicht in toxische Nebenprodukte degradiert zu werden [178]. Weiterhin ermöglichen Nanopartikel aufgrund der mit dieser Trägersubstanz zu erzielenden Größe ein subzelluläres *Targeting*.

1.4.1. Definition von Nanopartikeln

Nanopartikel wurden 1983 von der Arbeitsgruppe um Kreuter als feste, kolloidale Partikel definiert, die einem Größenbereich von 1 bis 1000 nm angehören und aus makromolekularen Stoffen hergestellt werden [178]. In den Partikeln liegt der Arzneistoff entweder gelöst, eingeschlossen, eingekapselt oder in auf der Oberfläche adsorbierter Form vor. Eine zusätzliche Unterteilung von Nanopartikel wurde von Alleman et al. [179] vorgenommen: er unterschied nach dem Aufbau des Nanopartikels in Nanokapseln und Nanosphärulen. Nanosphärulen bestehen aus einer Polymermatrix, die mehrere Möglichkeiten zur Beladung mit Arzneistoff eröffnet: einerseits kann der Arzneistoff direkt in der Matrix gelöst oder dispergiert sein, andererseits aber auch an der Oberfläche des Partikels gebunden vorliegen. Die adsorptive Bindung des Arzneistoffs beruht entweder auf hydrophoben/hydropilen oder ionischen Wechselwirkungen oder aber auf der Basis einer kovalenten Verknüpfung. Nanokapseln hingegen bestehen aus einem festen, flüssigen oder gasförmigen Kern, der von einer Polymerwand umgeben ist. Der Arzneistoff kann auch hier entweder im Kern eingeschlossen oder an der Oberfläche adsorbiert vorliegen.

1.4.2. Verteilung von Nanopartikeln im Körper

Nach i.v.-Applikation werden Nanopartikel zum größten Teil von dem retikulo-endotheliale System (RES), das auch mononukleär phagozytisches System (MPS) bezeichnet wird, aufgenommen. Es ist eine funktionelle Einheit von biologisch aktiven, durch Speicherung, Phagozytose und Immunkörperbildung ausgezeichneten Zellen des Mesenchyms. Hierzu zählen unter anderem Retikulum- und Endothelzellen der Milz und der Lymphknoten sowie die von Kupfferschen Sternzellen der Leber. Folglich sind die Hauptaufnahmeorte von nicht-modifizierten Nanopartikeln die Leber (80%), Milz (2-10%), Lunge (3-10%) und zu einem geringen Anteil das Knochenmark [184, 185]. Zur Therapie von Erkrankungen, die diese Organe betreffen, sind folglich mit Arzneistoff versehene Nanopartikel optimal geeignet (passives *drug-targeting*). Im Mausmodell konnte durch Bindung von Doxorubicin an Nanopartikel ein ausgeprägterer, antitumoraler Effekt auf Metastasen in der Leber nachgewiesen werden [186]. Jedoch sind die Ursachen der meisten Erkrankungen nicht mit diesem System in Verbindung zu bringen. Demzufolge sind Modifikationen nötig, die Nanopartikel vom RES abschirmen und damit die Erreichbarkeit anderer Wirkorte gewährleisten. Eine gezielte Suppression des RES durch Polystyrol oder Dextransulfat [187] ist theoretisch möglich, jedoch nicht in die Praxis umsetzbar, da auf diesem Wege ein ansonsten wichtiger Schutzmechanismus des Körpers, das RES, dessen Hauptaufgabe die Entfernung körperfremder Substanzen aus dem Blutkreislauf ist, vollständig ausgeschaltet wird. Auch die Option der Steuerung mittels magnetischer

Nanopartikel ist für eine Langzeittherapie ungeeignet [179]. Eine Verlängerung der Plasmahalbwertszeiten von Nanopartikeln, die durch eine reduzierte Aufnahme durch das RES erlangt wird, wird durch Modifikationen der Partikeloberfläche, wie ein Überzug mit Tensiden [179] oder die Bindung von langen, hydrophilen Polymerketten, das unter den Begriff der PEGylierung (Polyethylenglykol) fällt [188], erzielt.

1.4.3. Gelatine als optimales Ausgangsmaterial für Trägersysteme

Gelatine ist ein aufgereinigtes Peptidgemisch tierischen Ursprungs, welches durch den Prozess einer partiellen Hydrolyse aus natürlich vorkommendem Kollagen gewonnen wird. Hauptbestandteile der Gelatine sind Glycin (ca. 27%), die sauren Aminosäuren Glutamin- und Asparaginsäure (ca. 19%) und die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin (ca. 15%). Die Abfolge der einzelnen Aminosäuren folgt keinen festen Regeln, außer dass Glycin statistisch jede dritte Aminosäure ausmacht [189]. Gelatine wird auf Grundlage von physikochemischen Eigenschaften und von der Gewinnungsart in zwei verschiedene Klassen unterteilt: sie kann aus Schweineschwarten durch eine saure Aufspaltung gewonnen werden. Die resultierende Gelatine wird als Typ A (*acid*) bezeichnet. Der zweite, weit verbreitete Gelatintyp wird aus der Knochensubstanz von Rindern gewonnen und aufgrund des Aufspaltungsprozesses im basischen Milieu als Typ B für *basic* bezeichnet.

Beim Vergleich mit der Literatur ergeben sich einige Vorzüge für den Einsatz von Gelatine-Nanopartikeln. Gelatine vereint als Ausgangssubstanz für die Herstellung von Nanopartikel viele positiv zu bewertende Eigenschaften:

1. Gelatine ist ein natürliches, wasserlösliches Makromolekül, das stets in großen Mengen verfügbar und kostengünstig ist.
2. Gelatine zeichnet sich durch eine gute Verträglichkeit bei gleichzeitig geringer Antigenizität aus [190].
3. Gelatine wird seit vielen Jahren erfolgreich als Plasmaexpander in der Volumenersatztherapie bei guter Verträglichkeit angewendet (Gelafundin®, Gelafusal®).
4. Auf Basis von Gelatine hergestellte Partikel sind intravenös applizierbar und biodegradierbar; toxische Abbauprodukte, die im Körper akkumulieren und unerwünschte Wirkungen verursachen könnten, sind nicht zu erwarten [191].

Ein weiterer Vorteil liegt in der Vielzahl von Modifikationsmöglichkeiten. Potentielle Bindungsstellen, die chemisch leicht zugänglich und aktivierbar sind, eröffnen sich über die Seitenketten der Aminosäuren auf der Oberfläche von Gelatine-Nanopartikel. So können naive Nanopartikel durch Quervernetzung ihrer Oberfläche mit *Crosslinkern* gehärtet werden. Des Weiteren lassen sich Arzneistoffe wie auch Nukleinsäuren, je nach physikochemischen Eigenschaften, durch ionische oder hydrophile/hydrophobe Wechselwirkungen oder über eine kovalente Bindung an den Trägerpartikel fixieren. Auch andere funktionelle Moleküle, wie *targeting*-Proteine, können an die Oberfläche gebunden werden. In Anlehnung an *stealth*-Liposomen, die eine Aufnahme über das RES unterbinden, kann auch eine PEGylierung erfolgen.

1.4.4. Herstellungsverfahren von Nanopartikeln

Erste Beschreibungen von Verfahren zur Herstellung von Nanopartikel wurden Ende der 70iger Jahre veröffentlicht [180, 181]. Eine häufig angewandte Herstellungstechnik beruht auf der Polymerisation von gelösten oder in Emulsion vorliegenden Mono- oder Oligomeren, unter anderem kommen hier Polyacrylamide, Polyalkylmethacrylate oder Polyalkylcyanoacrylate zum Einsatz [179]. Andere Herstellungsrezepte setzen direkt dispergierte, natürliche Makromoleküle, wie Protamin und Albumin, oder synthetische Polymere, wie Polymilchsäure, ein. Am Beispiel der Grenzflächenpolymerisation soll diese Herstellungstechnik näher erläutert werden: es wird hierbei eine wässrige Phase, die mit einem Tensid stabilisiert wurde, in eine organische, äußere Phase hochdispers emulgiert, wobei Mizellen entstehen (W/O-Emulsion). Bei Zugabe eines geeigneten Monomers, wie z.B. L-Lysin, in die äußere Phase wird an der Grenzfläche spontan ein Polymerisationsprozess initiiert, der eine wässrige Mizelle mit Polymerhülle hervorbringt [182, 183]. Die Herstellung von Nanopartikeln aus hochdispersen, lipophilen W/O-Emulsionen findet vor allem bei natürlichen Polymeren wie Gelatine und Albumin breite Anwendung [182].

Beim Einsatz von Makromolekülen als Ausgangssubstanz wird aber auch häufig auf den Vorgang einer Präzipitation als Herstellungsverfahren zurückgegriffen. Die Präzipitation der Ausgangssubstanz erfolgt aufgrund einer Ladungsänderung, einer pH-Verschiebung oder durch Zugabe eines Desolvatationsreagenzes. Desolvatationsreagentien sind entweder ausgewählte Salze, die das Ausfällen eines Polymers bewirken, oder organische Lösungsmittel, die den Makromolekülen die Hydrathülle entziehen [182]. Für welches Herstellungsverfahren sich entschieden wird, hängt vordergründig von den physikalischen Eigenschaften des Polymers ab und von dem zu erzielenden Nanopartikeldurchmesser.

Herstellungsverfahren der in der vorliegenden Studie eingesetzten Gelatine-Nanopartikeln

In der pharmazeutischen Nanotechnologie wird Gelatine schon seit langem als eine sehr interessante, biodegradierbare Ausgangssubstanz für die Entwicklung von Partikeln aus den oben genannten Gründen gehandelt. Bereits 1978 wurde eine Präparationsmethode für Gelatine-Nanopartikel, die auf einem Desolvationsprozess beruht, beschrieben [181]. Die Qualität der Nanopartikel, die auf Basis dieser Methode hergestellt wurden, war nicht zufriedenstellend: die ermittelte Größe der resultierenden Partikel zeigte eine breite Verteilungskurve, des Weiteren tendierten die Partikel zur Instabilität und Aggregation und schließlich war eine Validierung des Herstellungsverfahrens nicht möglich. Die zugrundeliegende Ursache liegt in der Heterogenität der Ausgangssubstanz; Gelatine ist kein Protein mit definiertem Molekulargewicht, sondern ein heterogenes Gemisch (1 bis 10000 kDa) [192]. Die Problematik wurde mit der Entwicklung einer zweistufigen Desolvationstechnik beseitigt [191], die die Produktion von homogenen und stabilen kolloidalen Partikeln durch die Entfernung von niedermolekularen Gelatine-Bestandteilen ermöglicht. Zusätzlich wurde eine Methode zur Oberflächenmodifikation, die positiv geladene Partikel hervorbringt, entwickelt [193]. Der Beladungsprozess mit negativ geladenen Molekülen, wie Nukleinsäuren, wurde soweit optimiert, dass reproduzierbare Daten generiert werden können [194].

Die in einem Teilprojekt der vorliegenden Arbeit verwendeten Gelatine-Nanopartikel wurden am Institut für Pharmazeutische Technologie (Prof. Winter) der Ludwig-Maximilians-Universität München teilweise entwickelt und von K. Ziorek hergestellt. Im Folgenden soll kurz der Herstellungsprozess der Gelatine-Nanopartikel beschrieben werden [191]: Unter Erwärmen (70°C, Wasserbad) wird eine 5%ige Gelatinelösung (Gelatine Typ A, 175 Bloom) hergestellt und durch rasche Zugabe von Aceton sowohl eine Desolvation als auch eine anschließende Sedimentation der Gelatine erzielt. Dieser erste Schritt dient der Entfernung von niedermolekularen Gelatinekomponenten, die die Produktion von stabilen Nanopartikeln mit einer möglichst geringen Größenverteilung unmöglich machen würden. Der Überstand, der zum Teil aus desolvatisierter Gelatine sowie aus gelöster Gelatine besteht, wird verworfen und das Sediment erneut unter Erhitzen in Wasser dispergiert und auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt, um ideale Oberflächenladungsbedingungen für den anschließenden Herstellungsschritt zu schaffen. Durch erneute, tropfenweise Zugabe von Aceton erfolgt unter konstantem Rühren der zweite Desolvationsschritt. Die beim zweiten Desolvationsschritt entstandenen nativen Nanopartikel werden mit Glutaraldehyd (25%) durch intrapartikuläres Quervernetzen stabilisiert. Durch viermaliges Redispersieren und Zentrifugieren in Wasser werden die Nanopartikel in der Folge aufgereinigt. Zur Modifikation ihrer Oberfläche werden nacheinander 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), welches freie Carbo-

xygruppen zu einem aminoreaktiven Intermediat aktiviert, und Cholaminchlorid-Hydrochlorid zur Dispersion gegeben. Das primäre Amin des Cholamins reagiert mit dem reaktiven Intermediat, bildet ein Säureamid und verleiht somit dem Partikel eine positive Oberflächenladung [195] (Abb. 4).

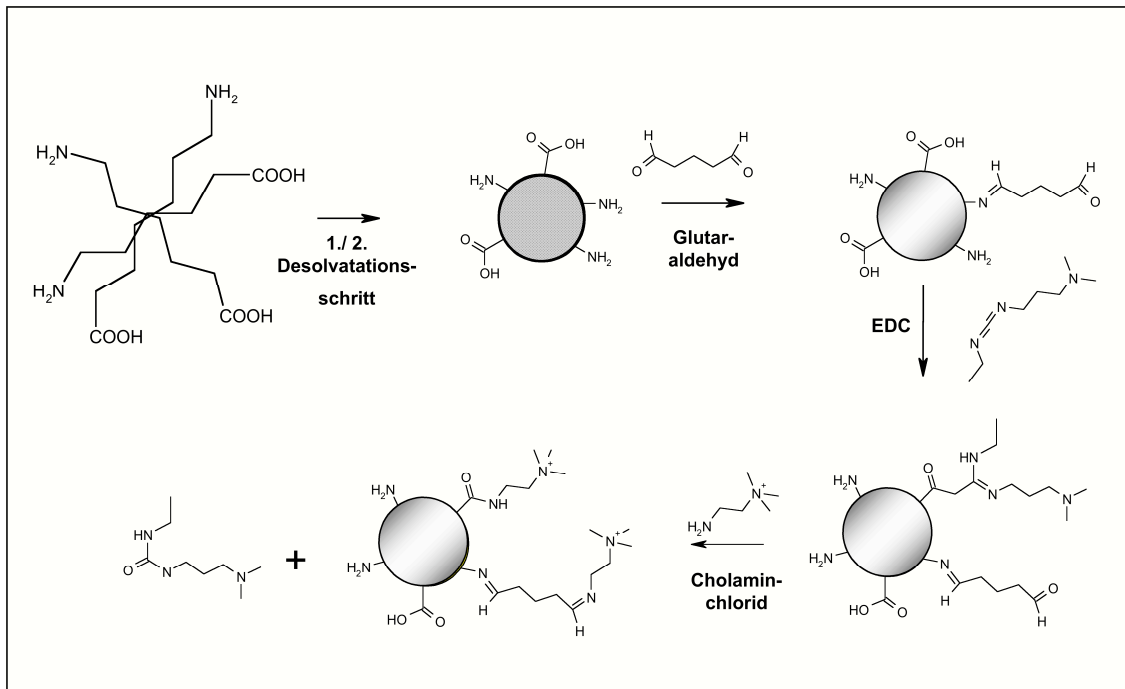


Abbildung 4 Herstellungsprozess der Gelatine-Nanopartikel nach [191, 195]

1.4.5. Anwendung von Nanopartikeln

Das Anwendungsspektrum von Nanopartikeln ist breitgefächert. Neben dem Einsatz in der Medizin als Wirkstoffträger sind weitere Anwendungsgebiete die medizinische Diagnostik (Durchflusszytometrie) sowie die chemische oder Lebensmittel-Industrie (z.B. Verarbeitung von Vitaminen) [196]. Die Bindung eines Wirkstoffs (in der hier vorliegenden Arbeit CpG-ODN) an kolloidale Partikel bietet folgende Vorteile:

1. Stabilitätserhöhung: Schutz des Wirkstoffs vor Abbau durch Nukleasen, was in einer verlängerten Halbwertszeit und einer höheren Bioverfügbarkeit resultiert; dies ist ein entscheidender Faktor für die *in vivo*-Applikation von CpG-ODN.

2. Retardierung des Wirkstoffs: verzögerte Freisetzung des Wirkstoffs aus dem Nanopartikel durch Auswahl einer entsprechenden Ausgangssubstanz
3. organspezifischer Wirkstofftransport (*drug-targeting*): mit Hilfe von galenischen Trägersystemen soll der Wirkstoff direkt an seinen Bestimmungsort gelangen. Wie oben erläutert wird von einem passiven *drug-targeting* gesprochen, wenn nach i.v.-Injektion ein Organ des RES der Bestimmungsort für die verabreichten Partikel ist. Bei einem aktiven *drug-targeting* weist hingegen das Trägersystem neben dem zu transportierenden Wirkstoff zusätzlich eine Spezifität zum Zielorgan auf (Organ- oder Gewebespezifische Antikörper).

I.5. Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

CpG-Oligodeoxynukleotide sind kurze einzelsträngige, synthetisch hergestellte Nukleinsäuren, die vom humanen Immunsystem als Gefahrensignale erkannt werden und die TLR9-exprimierenden Zellpopulationen, B-Zellen und PDCs, in einen Aktivitätszustand versetzen, der dem einer Infektion gleichkommt. Wie unter Punkt **I.2.5** erläutert, werden CpG-ODN in der Literatur vorwiegend auf Grundlage ihres immunstimulatorischen Aktivitätsmusters in zwei Klassen, CpG-A und CpG-B, eingeteilt: CpG-A-ODN werden hauptsächlich über die Induktion großer Mengen an IFN α in PDCs charakterisiert. Hingegen stellen CpG-B-ODN eine starke Stimulationsquelle für B-Zellen dar und überführen PDCs in einen aktivierten Zustand (erhöhte Expression von kostimulatorischen Molekülen und des Reifemarkers CD83); allerdings besitzen CpG-B-ODN nicht das Vermögen, die Sekretion von IFN α in PDCs zu induzieren. Obwohl die Einteilung von CpG-ODN in die zwei beschriebenen Klassen ursprünglich nicht auf Basis von strukturellen oder sequenzspezifischen Eigenschaften vorgenommen wurde, konnten dennoch im nachhinein Anforderungen an Strukturelemente, die sich durch eine entsprechende Basenzusammensetzung ergeben, für die jeweilige CpG-ODN-Klasse abgeleitet werden.

Gegenstand der hier vorliegenden Dissertation ist es, CpG-ODN-Sequenzen unter Zuhilfenahme der bereits vorhandenen Kenntnisse über CpG-ODN zu identifizieren, die die immunstimulatorischen Aktivitätsprofile beider CpG-ODN-Klasse kombinieren. Wir vermuteten die Existenz von CpG-Sequenzen, die bei Aufrechterhaltung einer optimalen B-Zellaktivierung gleichzeitig über die stimulatorische Kompetenz verfügen, PDCs zu aktivieren und IFN α zu induzieren. Anhand dieser CpG-ODN sollen wesentliche Sequenzelemente und die sich daraus ableitbaren Strukturen für das

jeweilige Aktivitätsmuster - B-Zellaktivierung und/oder Induktion von IFN α in PDCs - erarbeitet werden.

Des Weiteren soll die angenommene immunstimulatorische Potenz der neuen CpG-Sequenzen *in vitro* auf beiden TLR9-tragenden Zellpopulationen untersucht werden. Bei Erfüllung der gewünschten Voraussetzungen an die neuen CpG-ODN, die optimale Aktivierung von B-Zellen bei gleichzeitiger Stimulation der PDC zur Induktion von IFN α , könnten die neuen ODN als optimales Werkzeug zur Untersuchung der funktionellen Konsequenz einer TLR-vermittelten Stimulation beider TLR9-tragenden Zellpopulationen, die sich in Kokultur befinden, dienen. Diese Versuchsreihe könnte zur weiteren Aufklärung einer adaptiven Immunreaktion, vor allem zur Funktion der PDC in der humoralen Immunantwort, beitragen: die Literatur gibt Hinweise und lässt die Vermutung zu, dass PDCs und vor allem IFN α , das unter entsprechenden Voraussetzungen von PDCs sezerniert wird, die B-Zellaktivierung sowie den Differenzierungsprozess beeinflussen könnten.

In der hier vorliegenden Arbeit soll weiterhin ein Trägersystem für CpG-ODN in Anbetracht einer künftigen, klinischen Anwendung *in vitro* getestet werden. Es soll geklärt werden, ob sich das immunstimulatorische Aktivitätsprofil von CpG-ODN, die einen partikulären Charakter verliehen bekommen haben, verändert.

II. Material und Methoden

II.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

II.1.1. Geräte

FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Lamin Air (HB 244 8)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Begasungsbrutschrank (1384)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech Laboratories (Guernsey, GB)
Omnifuge 2 ORS	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Mikroskop (Axiovert 25)	Fa. Zeiss (Jena, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D))
MidiMACS	Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
MiniMACS	Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
Konfokalmikroskop LSM 510	Fa. Zeiss (Jena, D)

II.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Geneticin g-418 Sulfat	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
PharMLyse-Reagenz	Fa. BD PharMingen (Heidelberg, D)
EDTA (kristallin)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

EDTA-Lösung 0,02%	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Heparin-Natrium	Fa. Braun (Melsungen, D)
Kochsalzlösung 0,9%	Fa. Braun (Melsungen, D)
Wasser f. Injektionszwecke	Fa. Wyeth Pharma (Münster, D)
Brefeldin A	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSClean/ FACSRinse	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Glycerol	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
1,4-Diazabicyclooctan (DABCO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Mowiol® 4-88	Fa. Calbiochem (La Jolla, CA, USA)
Alexa® 594-Concanavalin A	Fa. Molecular Probes (Leiden, NL)
Alexa® 488-Concanavalin A	Fa. Molecular Probes (Leiden, NL)
Paraformaldehyd 4%-Lösung	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

II.1.3. Reagenziensätze

Zytokin-Bestimmung mittels ELISA:

IFN α -ELISA	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, NJ, USA)
IL-6-ELISA	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, CA, USA)
IL-10-ELISA	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, CA, USA)
TNF α -ELISA	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, CA, USA)
IgM-ELISA <i>Quantitation Kit</i>	Fa. Bethyl Laboratories (Montgomery, Texas, USA)

IgG-ELISA *Quantitation Kit*

Fa. Bethyl Laboratories (Montgomery, Texas, USA)

Zellisolation mittels der MACS-Methode:

BDCA-4 *Cell Isolation Kit*

Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)

CD19 *MicroBeads*

Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)

CD27 *MicroBeads*

Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)

CD3 *MicroBeads*

Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)

B Cell Isolation Kit I

Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)

B Cell Isolation Kit II

Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)

II.1.4. Materialien für die Zellkultur

RPMI 1640

Fa. Biochrom (Berlin, D)

humanes AB-Serum

Fa. BioWhittaker (Wakersville, USA)

fetales Kälberserum (FCS)

Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)

humanes Serumalbumin

Fa. Pharmacia & Upjohn (Erlangen, D)

Biocoll Separationsmedium (Ficoll)

Fa. Biochrom (Berlin, D)

Penicillin

Fa. PAA (Linz, A)

Streptomycin

Fa. PAA (Linz, A)

L-Glutamin

Fa. PAA (Linz, A)

PBS (*phosphate buffered saline*)

Fa. PAA (Linz, A)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von folgenden Firmen bezogen:

Fa. Greiner (Frickenhausen, D), Fa. Falcon (Heidelberg, D), Fa. Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Fa. Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB), Fa. Corning (Corning, USA), Fa. Nunc (Wiesbaden, D)

II.1.5. Zytokine und Antigene

Interleukin-3	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interleukin-15	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interferon α 2a	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, NJ, USA)
AffiniPure F(ab') ₂ Fragment	Fa. Dianova (Hamburg, D)
Goat anti-human IgA+IgG+IgM	
AffiniPure F(ab') ₂ Fragment	Fa. Dianova (Hamburg, D)
Goat anti-human IgM	

II.1.6. Medien und Puffer für die Zellkultur

RPMI-Vollmedium

RPMI 1640-Medium, 100 IU/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 1,5 mM L-Glutamin, 10 Vol% fötales Kälberserum oder 8 Vol% humanes AB-Serum

Erythrozyten-Lysepuffer

1 Teil PharMLyse-Reagenz, 9 Teile Wasser für Injektionszwecke; sterilfiltriert

MACS-Puffer

2mM EDTA (kristallin), 0,5 Vol% BSA, PBS, pH 7,2 - 7,4

Zur Isolation von B-Zellen werden noch zusätzlich 10% AB-Serum hinzugefügt.

DMEM-Selektionsmedium für die Kultivierung von CD40L-transfizierter Fibroblasten

DMEM-Medium, 5 Vol% fötales Kälberserum, 100 IU/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin, 200 μ g/ml Geneticin g418 Sulfat

Kryo-Medium

50 Vol% RPMI-Vollmedium, 40 Vol% humanes AB-Serum, 10 Vol% DMSO

TE-Puffer

10 mM TRIS-Chlorid, 1mM EDTA (kristallin), pH 8,0

II.1.7. Antikörper gegen humane Oberflächenmoleküle und Zytokine

Folgende Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Tabelle 2 In der hier vorliegenden Arbeit eingesetzte Antikörper

Name	Spezifität	Klon	Fluoreszenz	Hersteller
Anti BDCA-2	BDCA-2	AC144	-	Miltenyi Biotech
Anti CD123	CDw123	7G3	PE	BD/ Pharmingen
Anti CD14	CD14	M5E2	FITC	BD/ Pharmingen
Anti CD19	CD19	HIB19	APC	BD/ Pharmingen
Anti CD40	CD40	5C3	FITC	BD/ Pharmingen
Anti CD80	CD80	L307.4	PE	BD/ Pharmingen
Anti CD83	CD83	HB15e	FITC	BD/ Pharmingen
Anti CD86	CD86	2331	APC	BD/ Pharmingen
Anti HLA-DR	HLA-DR	L243	PerCP	BD/ Pharmingen
Lineage Cocktail I (lin 1)	CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56	SK7	FITC	BD/ Pharmingen
Anti CD20	CD20	2H7	PE	BD/ Pharmingen
Anti CD38	CD38	HIT2	APC	BD/ Pharmingen
Anti IgD	IgD	IA6-2	FITC	BD/ Pharmingen
Anti IFNα	IFN α	Poly	-	PBL
Anti IFNβ	IFN β	Poly	-	PBL

Anti IFNα-Rez. (CD118)	IFN α receptor chain 2	MMHAR-2	-	PBL
Anti TNFα	TNF α	MAb11	PE	BD/ Pharmingen
Anti Interleukin-12	IL-12 p40+p70	C8.6	-	BD/ Pharmingen
Anti CD154	CD154		-	BD/ Pharmingen

II.1.8. Oligodesoxynukleotide (ODN)

Die in dieser Arbeit verwendeten ODN wurden freundlicherweise von der Fa. *Coley Pharmaceutical-Group* (Wellesley, MA, USA) zur Verfügung gestellt oder von der Firma *Metabion* (Martinsried, D) nach Auftrag synthetisiert. Es wurden hochkonzentrierte Stocklösungen (2000 $\mu\text{g/ml}$) in TE-Puffer hergestellt und bei -20°C aufbewahrt; weitere Verdünnungen (400 $\mu\text{g/ml}$), die zum Einsatz in Zellkultur hergestellt wurden, wurden mit PBS vorgenommen. ODN wurden üblicherweise in einer Konzentration von 3 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt, falls nicht ausdrücklich eine andere Konzentration angegeben ist. Vor dem Einsatz in Zellkultur wurden die ODN auf Endotoxinfreiheit getestet; hierfür wurde eine intrazelluläre TNF α -Färbung in Monozyten durchgeführt. Monozyten reagieren bereits auf kleinsten Mengen an Endotoxin mit der Produktion von TNF α ; dieser Test ist sensitiver als die kommerziell erhältlichen LAL-Tests.

Folgende Oligonukleotid-Sequenzen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Tabelle 3 Eingesetzten Oligonukleotide. Große Buchstaben sind Phosphorthioat-Verknüpfungen am 3'-Ende der jeweiligen Base, kleine Buchstaben stellen Phosphodiester-Verknüpfungen dar. CG-Dinukleotide sind fettgedruckt, das Palindromzentrum ist mit einem ":" gekennzeichnet.

Name	Sequenz
2006	5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3'
2216	5' Gggggacga:tcg tc GGGGGg 3'
M362	5' TCGTCGTCG TTC :GAACGACGTTGAT 3'

M358	5` TCGTCGTTGTCGACGA:TCGTCGATGGAT 3`
M352	5` TCGTCGAAC:GTTTCGAGATGAT 3`
M361	5` TCGTCGTTGTCGTTC:GAACGACGTTGAT 3`
M354	5` TCGTCGTTTTGTCGAAC:GTTTCGAGATGAT 3`
M356	5` TCGTCGACGA:TCGTCGATGAT 3`
M357	5` TCGTCGTCGT:ACGACGATGAT 3`
M355	5` TCGTCGTTC:GAACGAGATGAT 3`
M353	5` TCGTCGTTGTCGAAC:GTTTCGAGATGAT 3`
M383	5` TGCTGCTGCTTG:CAAGCAGCTTGAT 3`
M384	5` TGCTCGTCGTTC:GAACGACGTTGAT 3`
M385	5` TCGTCGTGCTTG:CAAGCACGTTGAT 3`
M386	5` TCGTCGTCGATCGTACGACGTTGAT 3`
M387	5` TCGTCGTCGTTC:GAACGACG 3`
M388	5` TCGTCGTCGTTC:GAACGACGTCGTT 3`

II.2. Zellulär - immunologische Methoden

II.2.1. Zellkulturen

II.2.1.1. Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsschrank (Fa. Heraeus, Hanau, D) bei einer Temperatur von 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem 5% CO₂/Luftgemisch. Alle Experimente mit Zellkulturen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem *Laminar-Air-Flow* durchgeführt.

II.2.1.2. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Anzahl der lebenden Zellen wurde ein Trypanblau-Ausschlußtest durchgeführt. Das Farbstoffanion bindet an zytosolische Proteine, wodurch tote Zellen lichtmikroskopisch blau erscheinen, während die überlebenden Zellen farblos bleiben. Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

II.2.1.3. Kultivierung von PBMCs

PBMCs oder aufgereinigte Zellpopulationen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten in RPMI-Vollmedium mit FCS- oder AB-Serum kultiviert. Bei Versuchen, in denen mit PBMCs gearbeitet wurde, wurde die Zellkonzentration stets auf 2 Mio/ml eingestellt. Bei den Kokulturversuchen (**I-II.2**) mit plasmazytoiden dendritischen Zellen und der jeweils aufgereinigten B-Zellsubpopulation wurde stets ein Verhältnis von 1:10 eingesetzt (10^5 bzw. 5×10^4 B-Zellen zu 10^4 bzw. 5×10^3 plasmazytoiden dendritischen Zellen).

II.2.2. Durchflusszytometrie

Die FACS-Analyse (*fluorescence-activated cell sorter*) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand von Oberflächenantigenen zu unterscheiden und zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen das entsprechende Oberflächenantigen markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch einen Laserstrahl geführt.

Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile führen zu einer Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) 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 hin untersucht. Der Laserstrahl regt das Chromophor der für die Oberflächenmarkierung 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 der Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenz ist dabei proportional

zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle.

Bei der direkten Immunfluoreszenz werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, die direkt an Oberflächenmoleküle 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 zuerst eingesetzten Antikörpers gerichtet ist.

Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt meist nicht vollständig, da meist spektrale Überlappungen zwischen den verschiedenen Fluorochromen vorliegen. Diese Überlappungen müssen durch Kompensationsvorgänge korrigiert werden. Warum die Kompensation erforderlich ist, erklärt sich aus den Wellenlängenbereichen des emittierten Lichts der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Die emittierten Wellenlängen können sich über einen weiten Bereich um einen Maximalwert erstrecken. Dabei kommt es vor, dass sich die Emissionswellenlängenbereiche zweier Fluorochrome überlappen. Von jedem registrierten Fluoreszenzsignal wurde folglich der Teil abgezogen, der durch Überlappung entstand. Ohne Kompensation führt die Überlappung zu falsch positiven Signalen.

Hierzu wurden bei jedem Versuch Kontrollproben hergestellt, bei denen jeweils nur eine Eigenschaft mit einem bestimmten Fluorochrom angefärbt wurde, während die anderen Fluorochrome, gebunden an Isotypen-Antikörper (Maus-IgG1, κ), als Negativkontrolle dienten und so die Kompensation ermöglichten, da hier sichtbar wurde, wie stark das bestimmte Fluorochrom in die anderen Kanäle hineinstrahlte. Ebenso konnte 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 ließen.

Tabelle 4 Übersicht über die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe und die dazugehörigen maximalen Emissions- und Exzitations-Wellenlängen

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitation	Emission
FITC (Fluorescein-Isocyanat)	494 nm	518 nm
PE (Phycoerithrin)	565 nm	575 nm
APC (Allophycocyanin)	650 nm	660 nm
PerCP (Peridinin Chlorophyll-a Protein)	488 nm	675 nm

II.2.2.1. Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Für FACS-Analysen wurden 5×10^5 - 3×10^6 Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen resuspendiert. Zur Färbung wurden die Zellen daraufhin 15 Minuten bei 4°C unter Lichtausschluß mit FITC, PE, PerCP oder APC gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) inkubiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde auf einem FACSCalibur gemessen und anschließend mit Hilfe der *Cell Quest*-Software analysiert.

II.2.2.2. Bestimmung von intrazellulären Molekülen

Zur Messung intrazellulärer Moleküle (z.B. Endotoxin-Test: intrazelluläre TNF α -Bestimmung in Monozyten) wurden die Zellen nach der konventionellen Oberflächenfärbung mit Formaldehyd-Lösung 4% für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierung, die eine Kreuzvernetzung verursacht, ist die Voraussetzung für die nachfolgende Permeabilisierung und soll das exprimierte, intrazelluläre Molekül über einen längeren Zeitraum stabil und dadurch den Verlust des Moleküls möglichst gering halten. Es schließen sich zwei Waschschrte an, um einen bestehenden Rest an Fixationslösung zu entfernen. Zur Permeabilisierung der Zellen erfolgte ein weiterer Inkubations-schritt: als Permeabilisierungsreagenz wurde das pflanzliche Detergens Saponin verwendet. Saponine interagieren mit Cholesterol der Zellmembran. Durch die permeabel gewordene Zellmembran wird den Antikörpern der freie Zugang in Richtung zu untersuchendes intrazelluläres Molekül erst ermöglicht. Die Analyse wurde dann wie oben beschrieben durchgeführt.

II.2.2.3. *Untersuchung der Aufnahme von ODN durch die plasmazytoide dendritische Zelle*

Die Aufnahme von FITC-markiertem CpG-ODN M362 oder 2006 von der PDC wurde neben der Konfokalmikroskopie (**II.2.5**) auch mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Hierzu wurden PDCs ($2,5 \times 10^5$ PDCs/ml) oder B-Zellen mit ODN M362 oder 2006 ($3 \mu\text{g/ml}$), das am 3'-Ende mit dem Farbstoff FITC markiert war, bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Als Negativkontrolle dienten PDCs, die über den gleichen Zeitraum allerdings bei 4°C inkubiert wurden. Bei 4°C ist der Prozess der Endozytose unterdrückt. Zur Entfernung von CpG-ODN, die auf der Zelloberfläche adhären, musste mindestens zweimal gründlich mit PBS gewaschen werden. Anschließend wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals im Durchflusszytometer analysiert. Bei der Auswertung des Experiments vergleicht man jeweils die Bedingung bei 37°C mit der entsprechenden Kontrollbedingung bei 4°C und erst die Differenz der beiden *mean fluorescence intensities* (MFI) stellt die tatsächlich aufgenommene Menge an CpG-Oligonukleotid dar.

II.2.3. *Aufreinigung von Zellpopulationen*

II.2.3.1. *Isolation von PBMCs*

Zur Isolation peripherer Blutlymphozyten (PBMC: *peripher blood mononuclear cells*) wurden entweder *buffy coats* oder frisches Spenderblut von gesunden Probanden verwendet. Die *Buffy coats* wurden freundlicherweise vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität Greifswald, für Versuchszwecke zur Verfügung gestellt. Als *buffy coat* bezeichnet man die Leukozytenmanschette, die man beim Abzentrifugieren von Vollblut erhält. Diese besteht aus plasmafreien, zellulären Bestandteilen des Blutes mit einem reduziertem Prozentsatz an Erythrozyten. Bei Verwendung von frischem Spenderblut wurde gesunden Probanden 200 ml Blut abgenommen, wobei in der Spritze pro 10 ml Blut $100 \mu\text{l}$ Heparin zur Unterbindung der Blutgerinnung vorgelegt wurde.

Die Isolation von PBMCs erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation über eine "Ficoll-Hypaque"-Lösung. Das synthetische Polysaccharid Ficoll ist ein neutrales, stark verzweigtes Polymer aus Saccharosemonomeren, die über Epichlorhydrin kreuzvernetzt sind. Ficoll besitzt aufgrund seiner spezifischen Dichte von 1.077 g/ml die Eigenschaft, in einer Dichte-Zentrifugation mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) an der Phasengrenze zwischen Blutserum und Ficoll anzureichern. Wegen ihrer höheren Dichte sedimentieren Erythrozyten und Granulozyten

unter die Ficollschicht. Thrombozyten hingegen befinden sich wegen ihrer geringeren Dichte in der Serumsschicht oberhalb der Ficoll-Schicht. Die Dichten der unterschiedlichen Blutzellen überschneiden sich teilweise. Daher muß man davon ausgehen, dass die PBMC-Fraktion stets mit basophilen Granulozyten und Thrombozyten kontaminiert ist. Zusätzlich bewirkt Ficoll die Agglutination von Erythrozyten und beschleunigt so deren Sedimentation

Für die PBMC-Präparation wurde das Blut auf acht 50 ml Röhrchen (*blue caps*) verteilt und mit sterilem 0,9% NaCl auf 50 ml aufgefüllt und vermengt. Es wurde in 12 *blue caps* jeweils 15 ml warmes Ficoll-Hypaque vorgelegt und das verdünnte Blut vorsichtig aufgeschichtet, ohne dass sich dabei die beiden Phasen vermischen. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt (800xg, 20°C, 25 Minuten, Beschleunigung 1, Bremsung 1) fand man in jedem *blue cap* von oben nach unten folgende Schichtung vor: Plasma, Ring aus mononukleären Zellen (MNC), Ficoll, Erythrozyten. Der PBMC-Ring wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues *blue cap* überführt, mit NaCl auf 50ml aufgefüllt und wiederum zentrifugiert (520xg, 20°C, 15 Minuten, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Vor allem musste bei diesem Isolationsschritt darauf geachtet werden, dass eine möglichst geringe Menge Ficoll in das nächste *blue cap* überführt wird, da dieses in gewissem Grad zytotoxisch wirkt. Anschließend folgten zwei weitere Waschschrte, bei denen zunächst der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit 10 ml NaCl resuspendiert und jeweils zwei Suspensionen zusammenpipettiert, erneut auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert wurden (400xg, 4°C, 7 Minuten, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Vor dem letzten Waschschrte wurde das Zellpellet in 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer (hypotone Lyse) resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine eventuell störende Erythrozyten-Kontamination zu minimieren. Zuletzt wird das Zellpellet in dem gewünschten Kulturmedium aufgenommen, die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblaufärbung gezählt und auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt. Die erwartete Ausbeute an PBMCs betrug bei durchschnittlichem Blutbild ca. 10^6 Zellen/ml Vollblut. Es wurden nur solche mononukleäre Zellfraktionen weiterverwendet, von denen über 95% den Supravitalfarbstoff Trypanblau dank intakter Zellmembranen ausschlossen.

II.2.3.2. *Aufreinigung mit der MACS-Technologie (magnetic-activated cell sorting)*

Bei dieser Trennmethode wurden Zellen mit speziellen Antikörpern markiert, die an paramagnetische Mikropartikel mit einem Durchmesser von 70 nm gekoppelt sind. Nachdem die Zellen für 15 Minuten in einem MACS-Puffer bei 4°C mit den entsprechenden *MicroBeads* inkubiert und markiert wurden, wurden sie gewaschen und in MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit markierten Zellen auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix

enthält. Die Säule wurde in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten eingebracht. Auf diese Weise gelang es, alle mit *MicroBeads* beladenen Zellen in der Matrix zurückzuhalten. Alle unmarkierten Zellen wurden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt, so daß nur die gewünschte Zellpopulation in der Säule zurückgehalten wird. Anschließend ließ sich die markierte Zellpopulation mit einem Stempel aus der Säule außerhalb des Magnetfeldes eluieren. Sowohl die markierte als auch die unmarkierte Zellfraktion kann anschließend in Kultur genommen werden. Das MACS-System kann entweder zur Anreicherung (Positivselektion) oder zum Ausschluß einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden. Zur Aufreinigung nach der MACS-Methode wurden in dieser Arbeit ausschließlich Reagentiensätze der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) nach entsprechendem Protokoll verwendet. Die Isolation der plasmazytoiden dendritischen Zelle erfolgte über das spezifische Oberflächenmolekül BDCA-4.

Für die Kokulturversuche (**III.2**) wurden die zwei B-Zellsubpopulationen - naive B-Zellen und B-Gedächtniszellen - wie folgt isoliert (Abb. 5): es wurde die Population der PDCs, wie oben beschrieben, isoliert und im Anschluss mit dem Durchfluss (nicht-markierte Zellfraktion; PDC depletierte PBMCs) eine Negativselektion der B-Zellfraktion vorgenommen. Hierfür wurde das *B cell isolation kit I* bzw. sein Produktnachfolger *B cell isolation kit II* eingesetzt: Die PDC-depletierten Zellen wurden mit einer Mischung aus Hapten-gekoppelten Antikörpern gegen T-Zellen (CD2, CD4), NK-Zellen (CD11b), Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen, Basophile, Thrombozyten und Erythrozyten (CD16, CD36, anti-IgE Antikörper) markiert. Nach zwei erfolgten Waschschritten wurden die Zellen mit einem magnetisch markierten Anti-Hapten-Antikörper inkubiert. Es erfolgte im Anschluss eine Negativselektion über eine Depletionssäule (CS-Säule, Miltenyi Biotec). Als Negativfraktion erhielt man die Gesamt-B-Zell-Fraktion, die für den beschriebenen Isolationsschritt nicht mit magnetisch markierten Antikörpern beladen wurden und als "*untouched*" B-Zellen bezeichnet werden. In einem weiteren MACS-Aufreinigungsschritt erfolgte die Auftrennung der "*untouched*" B-Zellen in naive B-Zellen und B-Gedächtniszellen. Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster für den Oberflächenmarker CD27 können die beiden B-Zellpopulationen gut voneinander getrennt werden: B-Gedächtniszellen exprimieren im Vergleich zu naiven B-Zellen auf ihrer Oberfläche den Marker CD27. Voraussetzung für den Erhalt von reinen B-Zellpopulationen ist, dass im ersten Isolationsschritt eine B-Zellpopulation ohne Verunreinigung mit T-Zellen, die ebenfalls auf ihrer Oberfläche CD27 tragen können, erhalten wird. Die CD27-positiven Zellen sind folglich die Population der B-Gedächtniszellen, die CD27-negativen Zellen (Durchfluss) entsprechen den naiven B-Zellen. Die durchflusszytometrisch ermittelte Reinheit der naiven B-Zellen (IgD⁺CD27⁻CD20⁺CD19⁺) und der B-Gedächtniszellen (IgD⁻CD27⁺CD20⁺CD19⁺) lag je nach Spender zwischen 80-90%.

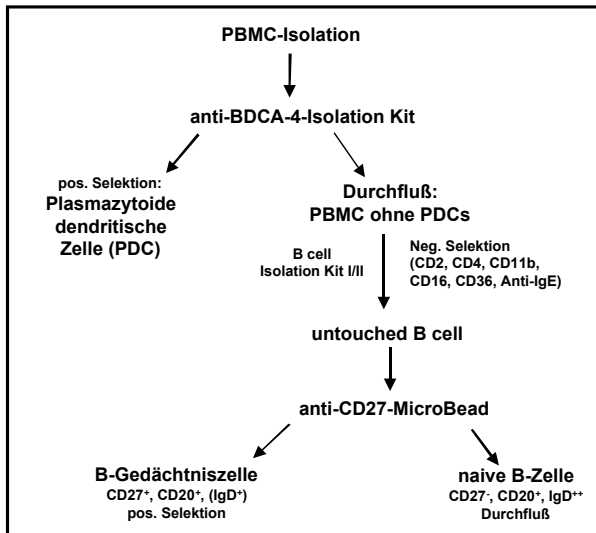


Abbildung 5 Schematische Darstellung der ersten Aufreinigungsmethode von plasmazytoiden dendritischen Zellen, naiven B-Zellen und B-Gedächtniszellen

Nachdem durch die Umstellung der Zusammensetzung des *B cell isolation kit I* große Reinheitsprobleme mit der oben beschriebenen Isolationsmethode auftraten (starke Verunreinigung mit T-Zellen), wurde bei der Isolation auf ein fertig zusammengestelltes Kit verzichtet und folgende Isolationsmethode angewandt (Abb. 6): Nach der Isolation der plasmazytoiden dendritischen Zelle wurde der Durchfluss (PDC-depletierte PBMCs) von allen CD3-positiven Zellen mit anti-CD3 *Micro-Beads* über eine CS-Säule depletiert. Damit hatte man die Fraktion der T-Zellen entfernt. Die Population der B-Gedächtniszellen wurde im Anschluss aus der Negativfraktion mit anti-CD27 *MicroBeads* mittels einer LS⁺-Säule positiv selektioniert. Daraufhin wurden aus der zurückbleibenden CD27-Negativfraktion die naiven B-Zellen über einen Positiv-Selektionsschritt mit anti-CD19 *MicroBeads* isoliert. Mit dieser Aufreinigungsmethode erzielte man im Durchschnitt für die Population der Gesamt-B-Zellen eine Reinheit von 96-98%. Naive B-Zellen waren um die 10% mit CD27⁺-B-Zellen verunreinigt, die aufgereinigte Population der B-Gedächtniszellen enthielt einen geringen Prozentsatz an naiven IgD⁺-B-Zellen (weniger als 8%). Aufgrund der guten Gesamt-B-Zellreinheit kann eine T-Zell-Verunreinigung nahezu ausgeschlossen werden.

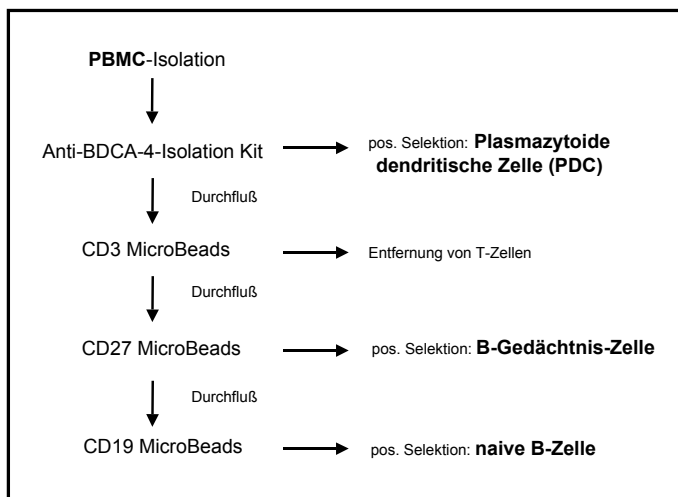


Abbildung 6 Schematische Darstellung einer weiteren Aufreinigungsmethode zur Isolation der für die Kokultur benötigten Zellpopulationen

II.2.4. ELISA

Zur Bestimmung verschiedener Proteine im Überstand von Zellkulturen wurde ein *enzyme-linked immuno sorbent assay* (ELISA) durchgeführt. Wie aus der Bezeichnung hervorgeht, bedient man sich beim ELISA eines Enzyms als Marker. So kann die Proteinkonzentration anhand des Substratumsatzes bestimmt werden. Weiterhin besagt der Name, dass eine Komponente an eine feste Phase adsorbiert ist. Zur Durchführung dieser Bestimmungsmethode wurden zellfreie Überstände abgenommen und falls nötig entsprechend mit Medium verdünnt. Neben einer Standardreihe mit bekannter Proteinmenge wurden alle Proben in die mit einem Protein-spezifischen Antikörper beschichteten *wells* pipettiert. Während einer zweistündigen Inkubationszeit bindet das vorhandene Protein an die Antikörper. Nach drei Waschschrritten wurde ein zweiter biotinylierter Antikörper zugegeben, der das bereits gebundene Protein an einem anderen Epitop bindet. Nach 30 Minuten folgt ein erneuter Waschschrtritt. Daraufhin wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben, welches an Biotin bindet. Durch die Verwendung mehrerer Biotin-Streptavidin-Brücken pro Antikörper wird eine Verstärkung sowie eine höhere Sensitivität erzielt. Nach Entfernung des Konjugates durch einen weiteren Waschschrtritt gibt man die Substratlösung hinzu, das gebundene Enzym wird zu Farbstoff umgesetzt. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure (2N) gestoppt. Die Farbintensität, die proportional zur Protein-Konzentration der Probe ist, wurde mittels eines *ELISA-Readers* eingelesen. Über die Standardreihe besteht die Möglichkeit die genaue, in der Probe enthaltene Konzentration zu berechnen.

II.2.5. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Zur Untersuchung des *uptakes* von mit CpG-ODN beladenenen Gelatine-Nanopartikel durch die plasmazytoide dendritische Zelle wurden Aufnahmen mit einem konfokalen Mikroskop durchgeführt. Entsprechende, datentechnisch erfasste Aufnahmen dienen der Dokumentation der Anreicherung von CpG-ODN bzw. von mit ODN-beladenen Nanopartikeln durch die plasmazytoide dendritische Zelle.

II.2.5.1. Das Funktionsprinzip

Das zu mikroskopierende Objekt wird im Fall der konfokalen Mikroskopie Punkt für Punkt mit einem Argon-Krypton-Laser abgetastet. Das dabei reflektierte Licht wird in der Passage einer Detektionslochblende (*pinhole*) von einem Photomultiplier aufgefangen und mittels Computer-

Software als Pixel auf dem Bildschirm abgebildet. Der Strahlengang bzw. die Funktionsweise eines CLSM ist in Abb. 7 dargestellt. Mit Hilfe einer speziellen Spiegeloptik können die optischen Ebenen des zu untersuchenden Objekts linienweise abgetastet (*gescannt*) werden und das entsprechende Bild erscheint simultan auf dem Bildschirm.

Durch die Anordnung der beiden Lochblenden (*pinholes*) ist es möglich, dass nur Informationen aus der fokussierten Ebene des Präparates zum Detektor gelangen. Von anderen Strukturen einstrahlendes Reflexionslicht kann die Detektorblende nicht passieren und wird auf diese Weise ausgeblendet. Durch die Vergrößerung der Öffnung des *pinholes* nimmt jedoch der Anteil des Streulichtes aus anderen Ebenen des Objekts zu und damit der konfokale Effekt ab, bis bei größter Öffnung die Abbildung mit der eines konventionellen Fluoreszenz-Mikroskopes vergleichbar ist. Somit ist es mit einem konfokalen Mikroskop möglich, optische Schnitte eines Präparates in der Z-Ebene anzufertigen und diese als Bildserie abzuspeichern. Durch spezielle Bildbearbeitungs-Software können die Einzelebenen zu dreidimensionalen Bildern zusammengesetzt werden. Dadurch können Strukturen innerhalb und außerhalb der zu beurteilenden Zellen betrachtet werden.

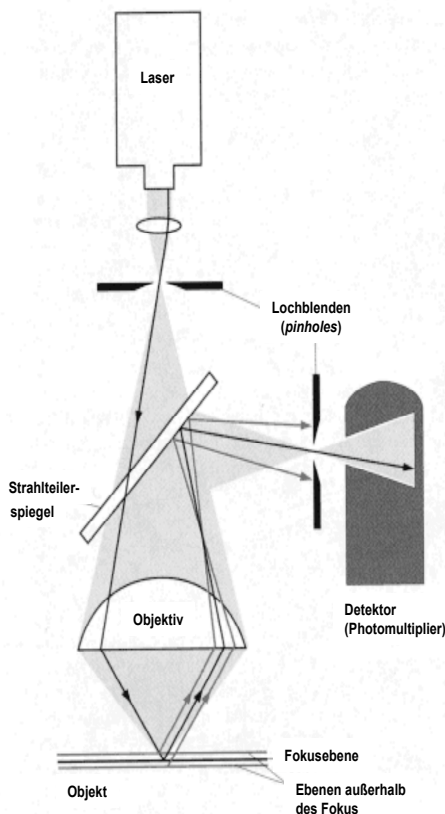


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Bildentstehung in der konfokalen Mikroskopie

Im Falle der durchgeführten Studien zur Aufnahme von mit CpG-ODN beladenen Nanopartikeln waren die Zellmembranen und die CpG-ODN mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Der eingesetzte Argon-Krypton-Laser verfügt über vier diskrete Laserlinien verschiedener Wellenlängen ($\lambda = 488, 568$ und 647 nm) und kann sowohl Fluoreszein als auch Rhodamin und dessen Modifikationen zur Fluoreszenz anregen. Durch optische Filter kann der jeweils unerwünschte Anteil des emittierten Fluoreszenzlichtes bei Mehrfachfärbungen ausgeblendet werden. Dadurch ist es möglich, mit einer 2-Kanal-Aufnahmetechnik die von den Zellmembranen bzw. von den beladenen Nanopartikel ausgehenden Fluoreszenzen getrennt aufzunehmen und die generierten Bilder anschließend übereinander zu lagern.

Zur Dokumentation der mittels konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie erhaltenen Bilder wurden entweder Fluoreszenzaufnahmen einer optischen Ebene der Zellen oder Aufnahmen von 42 Schnittebenen durch die Zellen erstellt, um anhand der dreidimensionalen Darstellung besser beurteilen zu können, ob und wo sich die Partikel in der Zelle befinden oder ob es sich lediglich um Adhäsion der beladenen Nanopartikel an der Oberfläche der plasmazytoiden dendritischen Zelle handelt. Die generierten digitalen Daten wurden gespeichert und im direkten Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen ausgewertet.

II.2.5.2. Präparation des zu untersuchenden Probenmaterials

Für die *uptake*-Experimente in plasmazytoide dendritische Zellen wurden zur Beladung der Nanopartikel CpG-ODN verwendet, die am 3'-Ende mit Fluoreszein markiert waren. Es wurde, wie unter **II.2.3.2** beschrieben, PDCs ($2,5 \times 10^5$ PDCs/ml) isoliert, mit IL-3 (10 ng/ml) und einer CpG-ODN-Nanopartikel-Dispersion (3 μ g/ml) (**II.2.6**) im Brutschrank für einen definierten Zeitraum (10 Minuten) in Kultur gegeben. Die PDCs wurden in für das Konfokalmikroskop geeignete *Chamber-slides*® kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und die Zellen dreimal mit 200 μ l PBS-Puffer pH 7,4 gewaschen. Für die Fluoreszenzfärbung der Zellwände wurde 100 μ l 0,0005% Alexa®594-Concanavalin A in PBS-Puffer pH 7,4 für 1 Minute hinzugegeben. Bei diesem Farbstoff handelt es sich um ein mit Alexa®594 gelabeltes Lektin, das an α -Mannopyranosyl- α -Glucopyranosyl-Reste bindet; es werden damit alle Zellwände unspezifisch angefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 100 μ l PBS-Puffer aufgenommen und bei 4-8° Grad im Kühlschrank unter Lichtausschluss bis zur mikroskopischen Auswertung aufbewahrt. Die Zellen wurden mit einem Zeiss LSM 510 Konfokalmikroskop, das mit der Software LSM 510, Version 2.02, einem Ar/Kr-Laser (458 und 488 nm) und zwei He/Ne-Lasern (543

und 633 nm) ausgestattet ist, gesichtet. Die Linse, die für die Aufnahmen eingesetzt wurde, war eine Plan-Neofluar 40 1.3 Öl-Linse.

II.2.6. Beladung der Gelatine-Nanopartikeln

Die Beladung der positiv geladenen Nanopartikel erfolgte nach folgendem Protokoll: die Nanopartikel wurden 5%ig mit CpG-ODN (ODN 2006, 2216, M362) beladen und zu einem definierten Endvolumen mit PBS ergänzt. Nach intensivem Vortexen wurde die CpG-ODN-Nanopartikel-Dispersion für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einen Rüttler gegeben. Danach konnten die mit CpG-ODN beladenen Nanopartikel entweder sofort in Zellkultur eingesetzt werden oder für einen zeitlich späteren Versuch bei -20°C eingefroren werden. Mehrmalige Tau- und Einfrierzyklen veränderten die biologische Aktivität der beladenen Nanopartikel nicht. Die CpG-ODN beladenen Nanopartikel wurde so eingesetzt, dass die ODN-Konzentration 3 µg/ml betrug. Für die Vergleichsbedingungen, die mit ungebundenem CpG-ODN stimuliert wurden, wurde die gleiche Endkonzentration gewählt. Als Kontrollen dienten Nanopartikel, die mit dem Kontrolloligonukleotid M383 beladen waren.

III. Ergebnisse

III.1. Design einer neuen Klasse von CpG-ODN, die sowohl B-Zellen aktivieren als auch simultan große Mengen an IFN α in der PDC induzieren

III.1.1. Aufgereinigte B-Zellen zeigen keine Sensitivität gegenüber den Vertretern der CpG-A-Klasse

Trotz großer Bedeutung für die Unterscheidung der zwei Klassen von CpG-ODN wurde eine vergleichende Analyse der direkten Effekte von CpG-A (Prototyp ODN 2216) und CpG-B (Prototyp ODN 2006) auf aufgereinigten B-Zellen bis dato noch nicht durchgeführt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch CpG-A-ODN indirekt eine Vielzahl von Zellpopulationen, die kein TLR9 exprimieren, wie Monozyten, NK-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen, aktiviert werden können [97]. Die Möglichkeit einer indirekten Aktivierung der TLR9-tragenden B-Zelle wurde jedoch nicht bedacht. Aus diesem Grund untersuchten wir, ob Vertreter der CpG-A-Klasse direkt B-Zellen aktivieren können oder ob eine CpG-A-vermittelte B-Zell-Aktivierung von der Anwesenheit weiterer Zellpopulationen abhängig ist.

Hierzu wurden PBMCs ($4 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$) mit dem genannten CpG-ODN in einer Konzentration von $3,2 \mu\text{g/ml}$ inkubiert. Nach 48 Stunden Inkubation wurde die Population der B-Zellen durchflusszytometrisch über das für B-Zellen spezifische Oberflächenmolekül CD19 ermittelt und die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf den CD19-positiven Zellen untersucht. Innerhalb der Population der PBMCs steigerten sowohl CpG-A- als auch CpG-B-ODN auf B-Zellen die Expression von CD86 (**Abb. 8A**). Überraschenderweise wurde bei der Untersuchung von aufgereinigten B-Zellen, die mit der *MACS*-Technologie isoliert wurden (Reinheit über 98%), festgestellt, dass lediglich CpG-B-ODN, nicht jedoch CpG-A-ODN, auf B-Zellen zu einem Anstieg der CD86-Expression führten. Eine indirekte B-Zell-Aktivierung, die über eine minimale Kontamination mit PDCs (kleiner 0,005%) vermittelt werden könnte, kann ausgeschlossen werden (**Abb. 8B**).

Der beobachtete, direkte Effekt von ODN 2006 auf B-Zellen, der mit CpG-A-ODN nicht nachgewiesen werden konnte, wurde mit einer intrazellulären Zytokinfärbung für IL-6 innerhalb von PBMCs bestätigt (**Abb. 8C**). In diesem Versuch kann ein eventueller Sekundäreffekt, der über lösliche Faktoren vermittelt wird, durch die Anwesenheit von Brefeldin A ($1 \mu\text{g/ml}$), welches die

Zytokinsekretion blockiert, ausgeschlossen werden. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass nur CpG-B befähigt ist, die B-Zelle direkt zu aktivieren, während B-Zellen, im Gegensatz zur PDC, nicht in der Lage sind, CpG-Motive, die in CpG-A enthalten sind, zu erkennen.

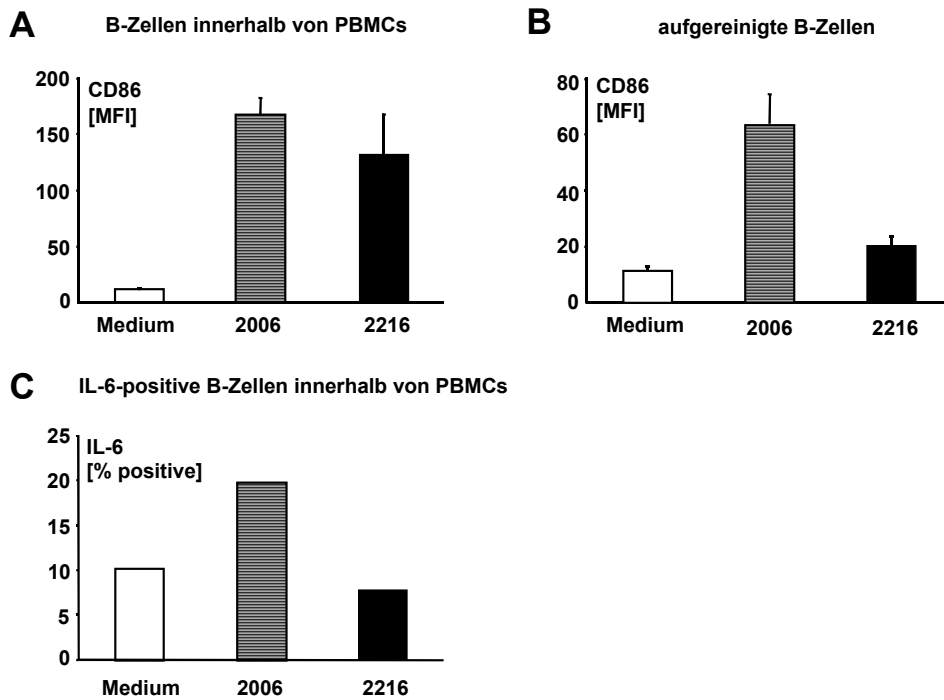


Abbildung 8 CpG-A kann B-Zellen innerhalb von PBMCs, jedoch nicht aufgereinigte B-Zellen aktivieren. PBMCs ($2 \times 10^6/\text{ml}$) (A) oder aufgereinigte B-Zellen ($2 \times 10^5/\text{ml}$) (B) werden mit $3,2 \mu\text{g}/\text{ml}$ CpG-A (2216) oder CpG-B (2006) inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die CD86-Expression auf CD19⁺-B-Zellen mittels der Durchflusszytometrie gemessen. Es wird der Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) von vier individuellen Spendern (Mittelwert \pm SEM) gezeigt. (C) PBMCs wurden mit ODN 2216 oder ODN 2006 inkubiert. Nach 12 Stunden wurde für vier weitere Stunden Brefeldin A ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) hinzugegeben und in einer intrazellulären Zytokinfärbung die IL-6-Produktion in CD19⁺-B-Zellen bestimmt. Ein repräsentatives Experiment von drei Versuchen wird hier gezeigt.

III.1.2. Identifizierung von CpG-ODN-Sequenzen, die sowohl aufgereinigte B-Zellen aktivieren als auch gleichzeitig große Mengen an IFN α in der PDC induzieren

CpG-A-ODN werden als starke IFN α -Induktoren in PDCs beschrieben [100], können jedoch B-Zellen, wie gerade erläutert, nicht direkt stimulieren. Wir vermuteten die Existenz von CpG-ODN, die IFN α in PDCs induzieren können, bei gleichzeitiger Wahrung der Fähigkeit, direkt B-Zellen zu aktivieren. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden einige neu entworfene CpG-ODN-Sequenzen (Tabelle 5) mit den Hauptvertretern der ODN-Klassen A und B bezüglich ihrer Fähigkeit, IFN α in PBMCs zu induzieren, verglichen. Die neuen Oligonukleotidsequenzen sind teils von den bereits etablierten Sequenzen ODN 2216 (CpG-A) und ODN 2006 (CpG-B) abgeleitet, leicht modifiziert oder enthalten neuen Sequenzkomponenten.

Name	Sequenz
2216	5` Ggggg <u>acga</u> : <u>tcgtc</u> GGGGGg 3`
M362	5` TCGTC <u>CGTC</u> GTTTC:GAACGACGTTGAT 3`
M358	5` TCGTCGTTG <u>TTCGACGA</u> :TCGTCGATGAT 3`
M352	5` TCGT <u>CGAAC</u> :GTT <u>CGAGAT</u> GAT 3`
M361	5` TCGTCGTTG <u>TTCGTTTC</u> :GAACGACGTTGAT 3`
M354	5` TCGTCGTTTTG <u>TTCGAAC</u> :GTT <u>CGAGAT</u> GAT 3`
M356	5` TCGT <u>TCGACGA</u> :TCGTCGATGAT 3`
M357	5` TCGT <u>TCGTCGT</u> :ACGACGATGAT 3`
M355	5` TCGT <u>CGTTC</u> :GAACGAGATGAT 3`
M353	5` TCGTCGTTG <u>TTCGAAC</u> :GTT <u>CGAGAT</u> GAT 3`
2006	5` TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3`

Tabelle 5 Die Oligonukleotidsequenzen sind nach ihrer Aktivität, IFN α in PBMCs zu induzieren, aufsteigend geordnet. Alle Sequenzen mit Ausnahme von ODN 2216 haben ein 5`-TCGTCG-Motiv. Die Palindromsequenz ist jeweils unterstrichen und das Palindromzentrum ist mit einem „:“ gekennzeichnet. CG-Dinukleotide sind fettgedruckt. Große Buchstaben sind Phosphorthioat-Verknüpfungen am 3`-Ende der jeweiligen Base, kleine Buchstaben stellen Phosphodiester-Verknüpfungen dar.

ODN 2216 als ein Vertreter der CpG-Klasse A induzierte, wie bereits in der Literatur beschrieben, große Mengen an IFN α innerhalb von PBMCs, ODN 2006 hingegen zeigte ein geringes Vermögen zur Induktion von IFN α [100] (Abb. 9A). Mit den neuen Sequenzen wurde eine Gruppe von CpG-ODN identifiziert, die ebenfalls die Sekretion beträchtlicher Mengen an IFN α induzieren können.

Allerdings konnte mit den neuen Sequenzen nicht die Größenordnung an IFN α -Mengen, die mit CpG-A-ODN erzielt werden, erreicht werden.

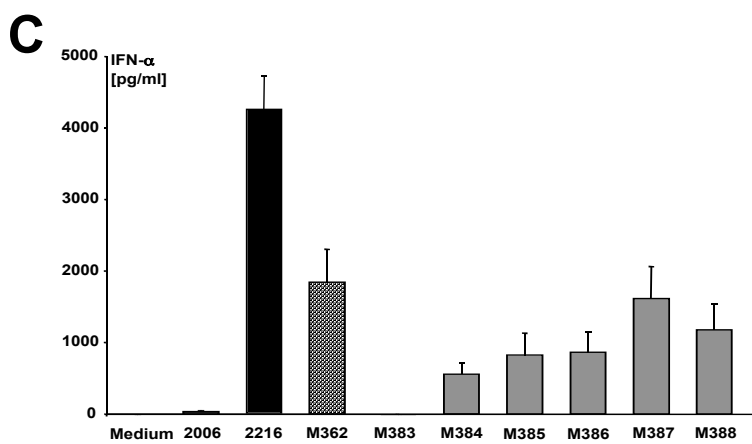
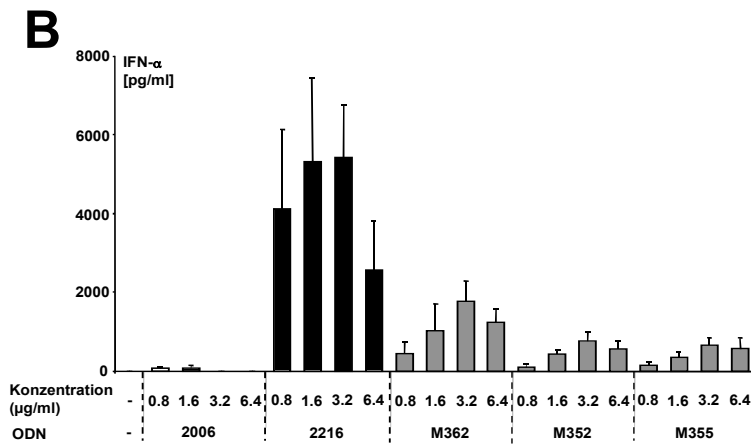
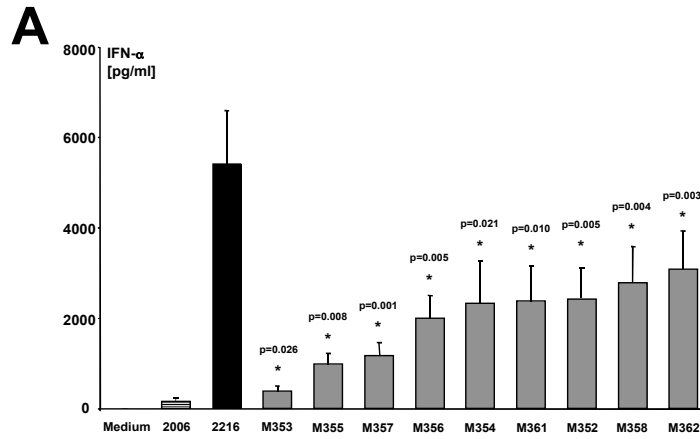


Abbildung 9 Vergleich von unterschiedlichen CpG-ODNs in Bezug auf ihre Fähigkeit, IFN α in PBMCs zu induzieren, und die Auswahl von M362 als die aktivste Sequenz. PBMCs (2×10^6 /ml) wurden mit ODN 2216, ODN 2006 oder mit einer der neuen CpG-Sequenzen stimuliert (siehe Tabelle 5; ODN-Konzentration 3,2 μ g/ml). Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Konzentration von IFN α im ELISA bestimmt. (A) Hier wurde die immunstimulatorische Aktivität der CpG-ODN auf PBMC-Ebene untersucht (Mittelwert \pm SEM bei n=12). *p*-Werte zeigen die statistischen Unterschiede in der Produktion von IFN α im Vergleich zu CpG-B-ODN 2006 auf. (B) Eine Dosis-Wirkungs-Studie ausgewählter CpG-ODN ist dargestellt; eingesetzter Konzentrationsbereich 0,8-6,4 μ g/ml (Mittelwert \pm SEM; n=4). (C) Die Sequenzspezifität für die Induktion von IFN α in PBMCs wurde mit einem Panel von Kontrolloligonukleotiden zu der ODN-Sequenz M362 getestet (siehe Tabelle 6). Die Mittelwerte \pm SEM von sechs unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Name	Sequenz
M362	5` TCGT <u>TCGTCG</u> TTC:GAACGACGTTGAT 3`
M383	5` TGCTGCTGCTTG:CAAGCAGCTTGAT 3`
M384	5` TGCT <u>CGTCG</u> TTC:GAACGACGTTGAT 3`
M385	5` TCGT <u>CGTGCT</u> TG:CAAGCACGTTGAT 3`
M386	5` TCGTCGTCGATCGTACGACGTTGAT 3`
M387	5` TCGT <u>CGTCG</u> TTC:GAACGACG 3`
M388	5` TCGT <u>CGTCG</u> TTC:GAACGACGTCGTT 3`

Tabelle 6 Kontroll-Oligonukleotide zu ODN M362. Die Palindromsequenzen sind jeweils unterstrichen und das Palindromzentrum ist gekennzeichnet mit „:“. CG-Dinukleotide sind fettgedruckte Buchstaben. **M383**: alle CGs sind durch GCs ausgetauscht worden; **M384/M385**: partieller Austausch (5`-Ende oder die palindromische Region der Sequenz M362) der CG-Dinukleotide durch GC-Dinukleotide; **M386**: Sequenz enthält kein zentrales Palindrom; **M387**: das 3`-Ende endet mit der Palindromsequenz; **M388**: die Sequenz „ttgat“ am 3`-Ende wurde durch das humane CpG-Motiv „gtcgtt“ ersetzt.

Die Gruppe von neuen Sequenzen zeichnet sich durch die Kombination struktureller Merkmale, die in CpG-A- (Palindrom mit immunstimulatorischen CG-Dinukleotide) und CpG-B-ODN (eine 5`-TCGTCG`-Sequenz) enthalten sind, aus. Die aktivste der neuen IFN α -induzierenden Oligonukleotide ist die Sequenz M362, die das komplette "humane CpG-Motiv" (5`-GTCGTT-3`), das als ein charakteristisches Merkmal von CpG-B-Oligonukleotiden beschrieben wurde [95], in der palindromischen Region aufweist. Es wurde beobachtet, dass CpG-A-ODN ihre Fähigkeit, IFN α zu induzieren, verlieren, sobald das chimäre Phosphorthioat-Phosphodiester-Rückgrat durch ein komplettes Phosphorthioat-Rückgrat ersetzt wird [100]. Im Gegensatz dazu verfügen die neuen Sequenzen trotz des kompletten Phosphorthioat-Rückgrates über ein starkes Aktivierungspotential.

Man kann sich vorstellen, dass die Fähigkeit, unterschiedliche CpG-Motive zu erkennen, von Spender zu Spender individuell verschieden ist. Bei der Auswertung einer großen Anzahl von Spendern (n=12) konnte allerdings gezeigt werden, dass die Sequenz M362 konsistent die höchste Aktivität unter allen getesteten Sequenzen besitzt (**Abb. 9A**). Eine Dosis-Wirkungs-Studie bestätigt, dass die üblicherweise in Zellkulturversuchen eingesetzte Konzentration von 3,2 µg/ml für die Induktion von IFN α in PBMCs sowohl für CpG-A-ODN als auch für die neue Gruppe an CpG-ODN eine optimale Dosis darstellt (**Abb. 9B**).

Die immunstimulatorische Aktivität der Sequenz M362 ist nur in Gegenwart von CG-Dinukleotiden gegeben. Bei Inversion aller CG-Dinukleotide zu GC-Dinukleotide (M383) bleibt die IFN α -Sekretion im Vergleich zu M362 aus (**Abb. 9C**). ODN-Sequenzen, bei denen lediglich ein partieller Austausch von CG-Dinukleotide, wie bei M384 (Austausch am 5'-Ende) oder M385 (Austausch in der Palindromsequenz), vorgenommen wurde, zeigen bereits eine stark abweichende IFN α -induzierende Aktivität im Vergleich zu M362. Auch die Zerstörung des selbstkomplementären Bereichs limitiert bei Erhalt der immunstimulatorischen CG-Dinukleotiden die IFN α -induzierende Kapazität (M386). Das 3'-Ende der Sequenz M362 verfügt hingegen über einen unbedeutenden Einfluss auf die biologische Aktivität: das Beenden der Oligonukleotidsequenz mit dem Palindromelement (M387) sowie eine Modifikation des ursprünglichen 3'-Endes durch Einfügen eines zusätzlichen "humanen CpG-Motivs" (M388) wirkt sich nur in geringem Maße auf die Aktivierungskapazität aus (**Abb. 9C**).

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte der Nachweis erbracht werden, dass IFN α nach Stimulation mit CpG-ODN ausschließlich von PDCs produziert wird [100]. Zur Bestätigung, ob der Befund auch auf die neuen CpG-ODN-Sequenzen zutrifft, wurden PDCs aufgereinigt und unter identischen Versuchsbedingungen, die bereits für die oben beschriebenen PBMC-Versuche angewandt wurden, stimuliert. Die Inkubation von aufgereinigten PDCs mit M362 resultierte, wie zu erwarten war, in der Sekretion beträchtlicher Mengen an IFN α . Allerdings konnten die IFN α -Konzentrationen, die mit CpG-A erzielt werden, mit den neuen CpG-Sequenzen nicht erreicht werden (**Abb. 10**).

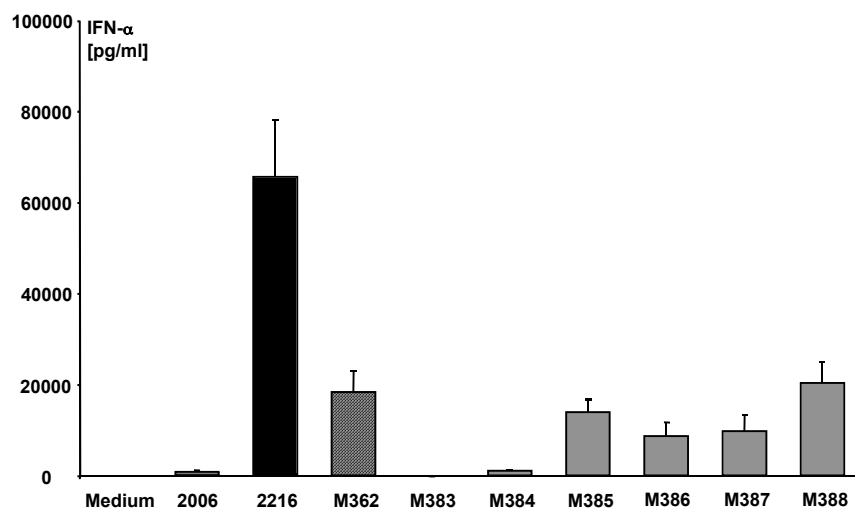


Abbildung 10 Induktion von IFN α und Untersuchung der Sequenzspezifität in aufgereinigten PDCs. Aufgereinigte PDCs ($5 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) wurden mit 2216, 2006, M362 sowie einiger ausgewählter Kontroll-ODN zu M362 (siehe Tabelle 6) in einer Konzentration von $3,2 \mu\text{g/ml}$ inkubiert. Nach 48 Stunden wurde in den Kulturüberständen mittels ELISA die Konzentration von IFN α bestimmt. Die Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die neuen CpG-ODN, im Gegensatz zu 2216 (**Abb. 8**), die Kompetenz besitzen, B-Zellen direkt zu stimulieren. Zur Klärung dieser Frage wurden aufgereinigte B-Zellen ($2 \times 10^5/200 \mu\text{l}$) mit 2006, 2216 oder M362 für 48 Stunden inkubiert. Als Maß für eine frühe B-Zell-Aktivierung wurde die Induktion von IL-6 analysiert. Nach Stimulation der B-Zellen mit der neuen Sequenz M362 war die Produktion von IL-6 unvorhergesehen hoch und konnte die IL-6-Mengen, die durch CpG-B-ODN hervorgerufen werden, weit übertreffen (**Abb. 11**).

Zusammengefasst präsentieren die in dieser Studie generierten Daten CpG-Oligonukleotidsequenzen (Prototyp M362) mit einem abweichenden immunstimulatorischen Muster im Vergleich zu CpG-A- und CpG-B-ODN: die hier identifizierte Klasse von CpG-ODN besitzt das Vermögen, beträchtliche Mengen an IFN α in der PDC bei gleichzeitiger, direkter Aktivierung von B-Zellen zu induzieren und vereint somit die immunstimulatorischen Eigenschaften beider bis dato etablierter CpG-Klassen.

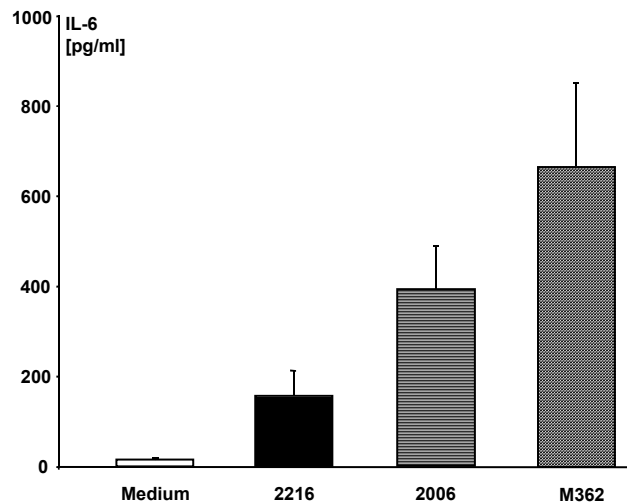


Abbildung 11 Vergleich der CpG-Oligonukleotidsequenzen in ihrer Fähigkeit, IL-6 in aufgereinigten B-Zellen zu induzieren. Aufgereinigte B-Zellen ($2 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$) wurden mit 2216, 2006 oder M362 in einer Konzentration von $3,2 \mu\text{g/ml}$ in Kultur gegeben. Nach 48 Stunden wurde in den Zellkulturüberständen die Konzentration von IL-6 im ELISA gemessen (Mittelwert \pm SEM von $n=9$).

III.1.3. Die Aktivierung der B-Zelle mit den neuen CpG-ODN-Sequenzen beruht auf direkten und indirekten Effekten

Es ist anzunehmen, dass die neuen CpG-ODN-Sequenzen nicht nur einen direkten Effekt auf die beiden TLR9-tragenden Zellpopulationen besitzen, sondern auch indirekt weitere Zellpopulationen verstärkt stimulieren können. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde die Produktion von IL-6 als ein Marker für eine kombinierte, direkte (IL-6-Produktion in B-Zellen und PDCs) sowie indirekte (sekundäre IL-6-Produktion in Monozyten) Aktivierung durch CpG-ODN in PBMCs beleuchtet. Tatsächlich war die Sequenz M362 aktiver in der Induktion von IL-6 in PBMCs als CpG-B- oder CpG-A-ODN (**Abb. 12A**). Die durchschnittlichen IL-6-Mengen, die in PBMC-Kulturen detektiert wurden, zeigten bei den Sequenzen der neuen ODN-Klasse nur geringfügige Unterschiede (siehe *p*-Werte in Fig. 12A). Vergleichbar zur Induktion von $\text{IFN}\alpha$ in PDCs durch CpG-C-ODN wurde auch für diesen Aktivierungsmarker eine CpG-Spezifität beobachtet: die Produktion von IL-6 in PBMCs war bei Stimulation mit dem Kontrolloligonukleotid M383, bei dem im Vergleich zu M362 alle CG- zu GC-Dinukleotiden ausgetauscht sind, nahezu auf den Mediumwert reduziert (**Abb. 12B**).

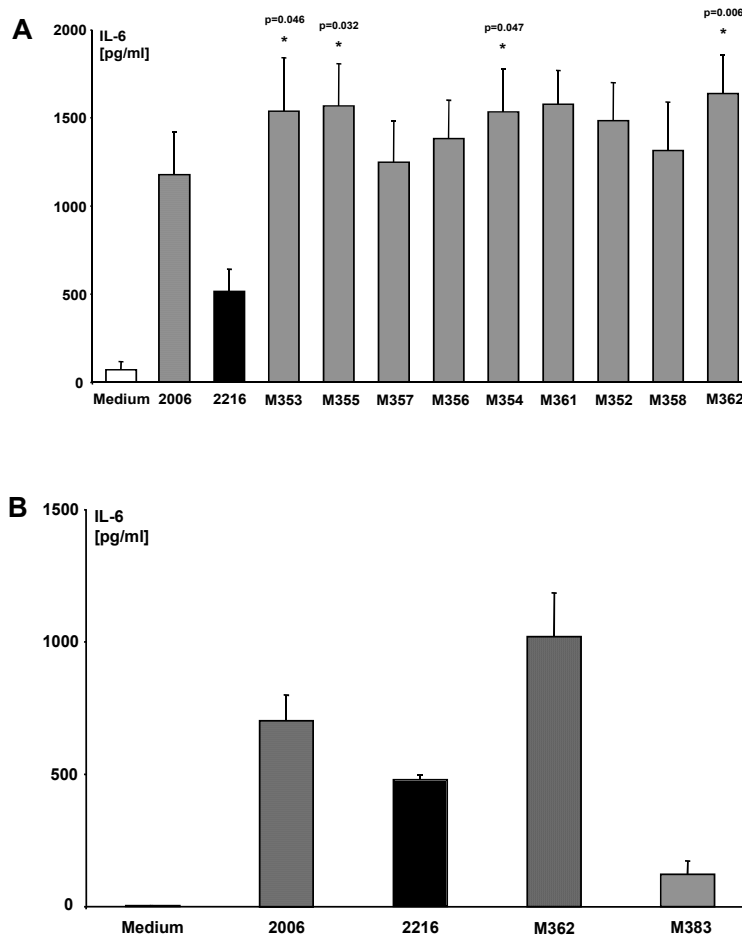


Abbildung 12 Vergleich der unterschiedlichen CpG-ODN-Sequenzen in ihrer Fähigkeit IL-6 in PBMCs zu induzieren. PBMCs ($2 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit den unterschiedlichen CpG-ODN ($3,2 \mu\text{g}/\text{ml}$) für 48 Stunden inkubiert. IL-6 wurde in den Überständen im ELISA bestimmt. (A) Das Panel der neuen IFN α -induzierenden CpG-ODN wurde mit CpG-A-ODN 2216 und CpG-B-ODN 2006 verglichen (Mittelwert \pm SEM; $n=9$). Die p-Werte zeigen die signifikanten Unterschiede zu 2006 auf. (B) Die Sequenz M362 wurde mit dem Kontrolloligonukleotid M383, in dem alle CG-Dinukleotide durch GC-Dinukleotide ausgetauscht wurden, verglichen (Mittelwert \pm SEM; $n=3$).

Um den Beitrag der CpG-ODN-stimulierten PDC an der B-Zellaktivierung sowie an der IL-6 Produktion zu untersuchen, wurde ein Versuch mit PDC-depletierten PBMCs unternommen. Die Depletion der PDC reduzierte die B-Zellaktivierung, die anhand des Oberflächenmarkers CD86 festgemacht wurde, erheblich. Die neuen CpG-ODN-Sequenzen zeigten folglich in Abwesenheit der PDC ein Aktivierungsmuster, das dem von CpG-B-ODN sehr ähnlich ist (**Abb. 13A**). Die IL-6-Produktion war in PDC-depletierten PBMCs in gleichem Maße wie der Aktivierungsmarker CD86 vermindert (**Abb. 13B**). Die Überlegenheit der neuen CpG-ODN-Sequenzen in der Aktivierung von B-Zellen basiert infolgedessen auf einer direkten Aktivierung der B-Zelle in Kombination mit einem indirekten Effekt, der über PDCs vermittelt wird.

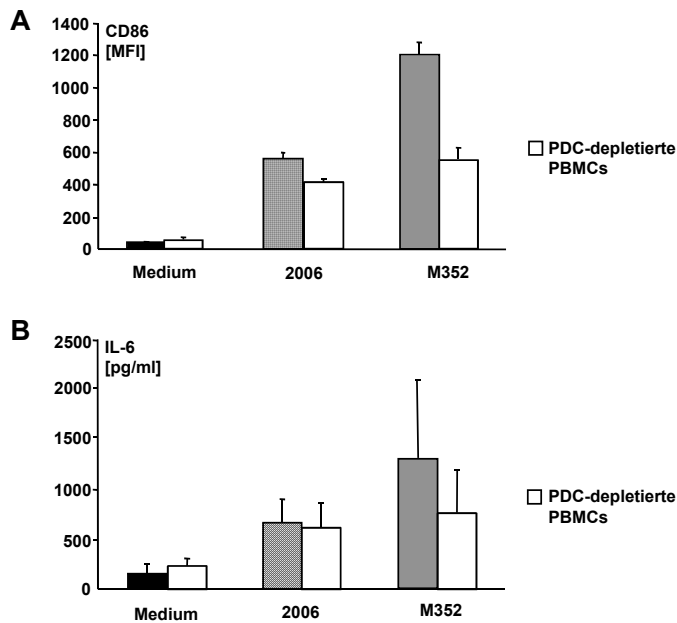


Abbildung 13 PDCs tragen zur stimulatorischen Aktivierung der B-Zelle bei. PBMCs (schwarze, schwarzgestreifte bzw. graue Balken) oder PDC-depletierte PBMCs (weiße Balken) ($2 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit 2006 oder M352 als ein Vertreter der neuen Gruppe von CpG-ODN wie oben beschrieben inkubiert. **(A)** Nach 48 Stunden wurde das kostimulatorische Molekül CD86 auf CD19⁺-B-Zellen mit der Durchflusszytometrie bestimmt (Mittelwert \pm SEM; $n=3$). **(B)** Zellkulturüberstände wurden nach 48 Stunden abgenommen und die Konzentrationen an IL-6 im ELISA ermittelt (Mittelwert \pm SEM; $n=3$).

III.1.4. Aufklärung von Strukturen, die die neuen CpG-ODN ausbilden können

Zur Strukturaufklärung der hier identifizierten CpG-ODN wurde die Methode der Gelelektrophorese eingesetzt. Die elektrophoretische Mobilität von Nukleinsäuren ist nicht ausschließlich von der absoluten Masse abhängig, sondern auch sekundäre Strukturen - superhelikale, einzelsträngige oder doppelsträngige Form – nehmen Einfluss auf die Laufgeschwindigkeit. Das hier gezeigte Agarosegel sollte der Strukturanalyse des Prototyps von CpG-C-ODN im Vergleich zu den Prototypen der Klasse A (2216) und B (2006) dienen. Es kamen Agarosegele zum Einsatz, die einen Anhaltspunkt für eine eventuell vorliegende Struktur liefern. Agarosegele, die den Vorteil einer einfachen Herstellung und leichten Handhabung besitzen, haben jedoch den Nachteil eines geringen Auftrennungsvermögens für DNA, die weniger als 100 bp (Basenpaare) umfasst. Zur Reproduktion und Bestätigung des gesehenen Bandenmuster müsste mit sensitiveren Methoden, wie einem Polyacrylamidgel unter physiologischen Bedingungen, gearbeitet werden. Polyacrylamidgele verfügen über ein höheres Auftrennungsvermögen (DNA-Stränge mit 5-500 bp sind auftrennbar) und eine größere Ladekapazität ohne Auflösungsverluste. Genauere Strukturanalysen werden zurzeit im Labor von Christine Richter vorgenommen.

Die Tatsache, dass CpG-A-ODN starke IFN α -Induktoren sind, wird unter anderem auf die für diese CpG-ODN-Klasse spezifischen Sequenzelemente (PolyG-Motiv und ein zentraler selbst-

komplementärer Bereich) und die sich daraus ergebenden höhermolekularen, tertiären Strukturen zurückgeführt. Im Gegensatz dazu weisen CpG-B-ODN keine strukturbildenden Zentren auf [206]. Wir nahmen an, dass der palindromische Sequenzbereich der neuen CpG-ODN die Basis für die Verknüpfung von komplementären Basen zu einer partiellen Duplexstruktur bildet und dass eine höhere Struktur des CpG-C-ODN mit der immunstimulatorischen Aktivität korreliert.

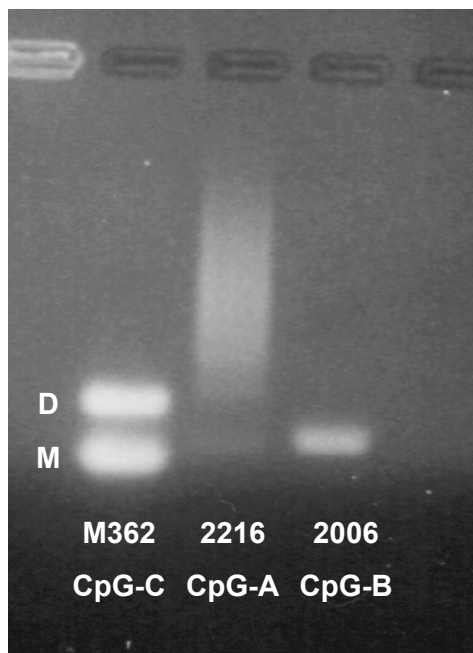


Abbildung 14 Strukturanalyse der Prototypen der drei CpG-ODN-Klassen Strukturanalyse der Prototypen der drei CpG-ODN-Hauptklassen, M362, 2216 und 2006 auf einem 3,5% Agarosegel. Auftragspuffer Bromphenolblau in 30% Glycerol, Detektion erfolgte mit Ethidiumbromid.

Es wurde ein 3,5% Agarosegel mit 1xTBE (89 mM Tris-borat, 2 mM EDTA, pH 8,0) hergestellt. Nach Beendigung des Polymerisationsprozesses wurde das Gel in eine Elektrophoreseapparatur überführt und die Elektrophoresekammer bis zur vollständigen Abdeckung des Gels mit Laufpuffer (1xTBE) gefüllt. Dann erfolgte der Probenauftrag: die jeweiligen Proben (1,2 µg ODN in 3 µl Auftragspuffer (0,05% Bromphenolblau in Glycerol)) wurden in die Geltaschen pipettiert und eine Spannung von Volt und eine Stromstärke von 80 Ampere angelegt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, als das gut sichtbare Bromphenolblau des Auftragspuffers zu dreiviertelt die Platte passiert hatte.

Die auf den Gelen gesichteten Banden können die Annahmen bestätigen: die Hauptvertreter der drei CpG-ODN-Klassen unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit intra- und intermolekulare Bindungen einzugehen. CpG-B zeigt ein einheitliches Laufverhalten. Es ist eine deutlich begrenzte Bande erkennbar, die einer monomeren Form gleichkommt. CpG-A hingegen kann auf einem Agarosegel nicht in definierte Banden aufgetrennt werden. Der "Bandenschmier" entspricht einem heterogenen Gemisch von vielen, nicht definierbaren Strukturen, die sich teilweise aus mehreren CpG-A-

Molekülen zusammensetzen. Es ist beschrieben, dass nicht-definierbare Banden für höhermolekulare Komplexe Guanin-reicher Oligonukleotide charakteristisch sind (8, 9).

CpG-C-ODN M362 hat sich in zwei definierte Banden aufgetrennt (Abb. 14). Die Bande D ist aufgrund der ermittelten Laufhöhe vermutlich einem Molekül mit partieller Duplexstruktur und einzelsträngigen Überhängen zuzuordnen, die Bande M hingegen scheint der monomeren Form des Oligonukleotids M362 zu entsprechen. Überraschend war der Befund, dass die monomere Form von M362 das Gel geringfügig schneller als ODN 2006 passierte und aufgrund der abweichenden Sequenzlängen der beiden ODN (25 Basen versus 24 Basen) ein umgekehrtes Ergebnis erwartet wurde. Es kann die Annahme erhoben werden, dass das ODN M362 neben der Einzelstrang-Konformation auch eine *hairpin*-Struktur ausbilden kann, die angesichts einer "kugeligen" Gestalt schneller die Gelporen durchdringen kann. Demnach entspricht die Bande M von ODN M362 einem Gemisch von unterschiedlichen monomeren Strukturen und zeigt ein verändertes, schnelleres Laufverhalten als unter der Voraussetzung, dass M362 nur in linearer Form vorliegen würde.

III.2. B-Zell-PDC-Interaktion unter Stimulation mit CpG-C-ODN M362

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine neue CpG-ODN-Klasse etabliert und charakterisiert. Der Prototyp M362 führt zur optimalen Aktivierung beider TLR9-tragenden Zellpopulationen, B-Zellen und PDCs, und stellt demzufolge ein geeignetes Werkzeug zur Untersuchung der funktionellen Konsequenz einer TLR-vermittelten Stimulation dieser Zellpopulationen dar.

Wie die gerade gezeigten Ergebnisse mit PDC-depletierten PBMCs verdeutlichen, scheint die PDC unter bestimmten Stimulationsbedingungen auf das immunologische Verhalten von B-Zellen Einfluss zu nehmen (III.1.3). Anlass zur näheren Untersuchung gab zusätzlich eine Veröffentlichung, die beschreibt, dass IFN α eine humorale Immunantwort verstärken kann [41]. Wir nahmen folglich an, dass in einer autologen Kokultur von aufgereinigten B-Zellen und PDCs unter dem IFN α -induzierendem Stimulus ODN M362 die Aktivierung und Differenzierung der B-Zelle beeinflusst werden könnte. Als zusätzliche Stimulationsquelle wurde das B-Zellrezeptor(BCR)-Antigen anti-Ig eingesetzt, von dem beschrieben ist, dass es bei simultanem Einsatz mit einem CpG-ODN vor allem die Aktivierung von naiven B-Zellen potenzieren kann.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden PDCs und B-Zellen nach Protokoll isoliert (**II.2.3**). Die Zellpopulation von B-Zellen wurde auf Basis ihrer Oberflächenmoleküle weiter in B-Gedächtniszellen (CD27⁺, IgD⁻, CD19⁺) und naive B-Zellen (CD27⁻, IgD⁺, CD19⁺) aufgeteilt, um in Erfahrung zu bringen, ob beide Subpopulationen über ein vergleichbares immunologisches Verhalten verfügen und ob die PDC eine der B-Zellsubpopulationen insbesondere fördert.

III.2.1. Die Anwesenheit der PDC verstärkt die Zytokinproduktion unter dem Stimulus CpG-ODN M362 und anti-Ig in beiden B-Zellpopulationen

Zur Untersuchung der Zytokinproduktion humaner B-Zellen in der Gegenwart von PDCs wurden naive B-Zellen und B-Gedächtniszellen getrennt isoliert und mit PDCs (+ 10 ng/ml IL-3) in einem Verhältnis 1:10 (1x10⁴ PDC auf 1x10⁵ B-Zellen) in Kokultur gegeben. Als Stimulus wurde entweder ODN M362 (3 µg/ml), der B-Zellrezeptor-Stimulus anti-Ig (2 µg/ml) oder eine Kombination von beiden Reagenzien eingesetzt. Nach 72 Stunden Inkubation wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und mittels ELISA auf die gesuchten Zytokine, IL-6 und IL-10, hin untersucht. IL-6/IL-10 gehören zu den Zytokinen, die als erstes als Antwort auf CpG-ODN von B-Zellen produziert werden.

Sowohl in den Kokultur-Bedingungen der naiven B-Zellen als auch der B-Gedächtniszellen konnten in den Überständen beträchtliche Mengen an IL-6 und IL-10 als Antwort auf die kombinierte Stimulation mit CpG-C und anti-Ig ermittelt werden (Abb. **15**). Die Anwesenheit der PDC steigerte die Produktion der Zytokine in beiden B-Zellpopulationen auf annähernd die doppelte Menge. Überraschend waren die hohen, CpG-C-induzierten Konzentrationen an IL-6 und IL-10 in den Überständen, die von den Kokulturbedingungen mit naiven B-Zellen gewonnen wurden: erstens war eine beträchtliche Steigerung der sezernierten Zytokinmenge durch die Anwesenheit der PDC zu verzeichnen, die nochmals durch die zusätzliche Stimulation über den B-Zellrezeptor potenziert werden konnte.

Die beobachtete Abstufung in den detektierten Zytokinmengen je nach Stimulationsart war bei den Bedingungen mit B-Gedächtniszellen in geringerem Ausmaß gegeben. Vor allen Dingen war die Differenz zwischen der CpG-C-induzierten Zytokinmenge und der Menge, die nach kombinierter Stimulation mit anti-Ig gemessen wurde, schwächer ausgeprägt. Die Stimulation allein über den B-Zell-Rezeptor, auch in Anwesenheit der PDC, brachte IL-6- und IL-10-Mengen in beiden B-Zellsubpopulationen hervor, die mit dem Mediumwert vergleichbar waren. Beim Vergleich der

Skalierung der Achsen war auffallend, dass die Zytokinkonzentrationen in den Überständen der Bedingungen mit naiven B-Zellen im Vergleich zu denen mit B-Gedächtniszellen konsistent höher waren.

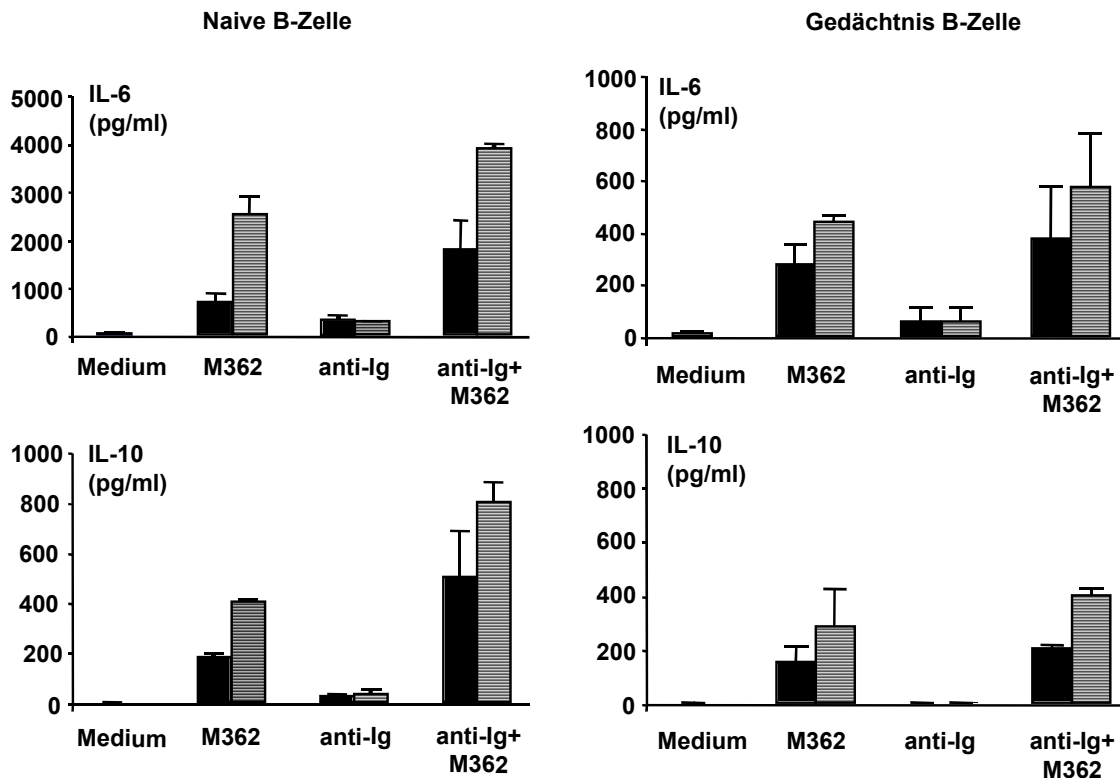


Abbildung 15 Die Anwesenheit der PDC verstärkt die Zytokin-Produktion unter dem Stimulus ODNM362 und anti-Ig in naiven B-Zellen und B-Gedächtnis-Zellen. Naive B-Zellen (n=8) oder B-Gedächtniszellen (n=3) wurden alleine (schwarze Balken: 1×10^5 B-Zellen pro $200 \mu\text{l/well}$) oder mit PDCs (gestreifte Balken: 1×10^4 PDC pro $200 \mu\text{l/well}$) inkubiert und wurden mit CpG-ODN M362 ($3 \mu\text{g/ml}$), anti-Ig ($2 \mu\text{g/ml}$) oder einer Kombination aus ODN M362 und anti-Ig stimuliert. Nach 72 Stunden wurde IL-6 und IL-10 in den Zellkulturüberständen im ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

III.2.2. Die PDC fördert die Plasmazelldifferenzierung sowohl der naiven B-Zelle als auch der B-Gedächtniszelle

Die vorausgegangenen Daten unterstützen die Spekulation, dass PDCs neben dem positiven Einfluss auf die Zytokinsekretion auch B-Zellen in ihrem Differenzierungsprozess zur Plasmazelle fördern könnten. Der Aufbau des Experimentes entsprach dem gerade Beschriebenen, mit dem

Unterschied, dass die Auswertung des Versuches auf den Tag 8 verlegt wurde. Nach Ablauf der erforderlichen Inkubationszeit wurde die Population von Plasmazellen durchflusszytometrisch quantifiziert. Plasmazellen lassen sich über eine hohe Expression des Oberflächenmarkers CD38 und eine stark reduzierte Expression von CD20 charakterisieren [169, 170]. Hingegen exprimieren die eingesetzten Ausgangspopulationen, naive und B-Gedächtniszellen, ein abweichendes Profil an Oberflächenmolekülen, was eine eindeutige Zuordnung zu einer Plasmazelle erlaubt.

In der Abwesenheit der PDC war die kombinierte Stimulationsweise mit anti-Ig und ODN M362 nicht ausreichend, dass naive B-Zellen zur Plasmazellen differenzieren (Abb. 16B). Erst mit der Zugabe der PDC zur Zellkultur waren für naive B-Zellen die optimalen Voraussetzungen geschaffen, den Differenzierungsprozess zur Plasmazelle einzugehen. Der Unterschied in den detektierten Plasmazellfrequenzen mit und ohne PDC war beeindruckend. Während für die Plasmazellentwicklung von naiven B-Zellen die PDC eine wesentliche Funktion übernimmt, reagieren B-Gedächtniszellen bereits auf die Stimulation mit M362 und dem BCR-Antigen anti-Ig mit der Differenzierung zur Plasmazelle. Die Zugabe von PDCs zu den Kulturen mit B-Gedächtniszellen steigerte gleichfalls beträchtlich die Frequenz der Plasmazellen.

Bei der FACS-Analyse wurde neben den charakteristischen Oberflächenmarkern CD38/CD20 auch HLA-DR, das der Präsentation von prozessiertem Antigen dient, betrachtet. Wie auch als ein charakteristisches Merkmal von Plasmazellen beschrieben, weisen die hier betrachteten Plasmazellen (*Gate* R3) eine sehr geringe HLA-DR-Expression im Vergleich zu den nicht-ausdifferenzierten B-Zellen (*Gate* R2) auf (Abb. 16A). Die ausdifferenzierte B-Zelle hat nunmehr die neue Funktion, Immunglobuline zu produzieren.

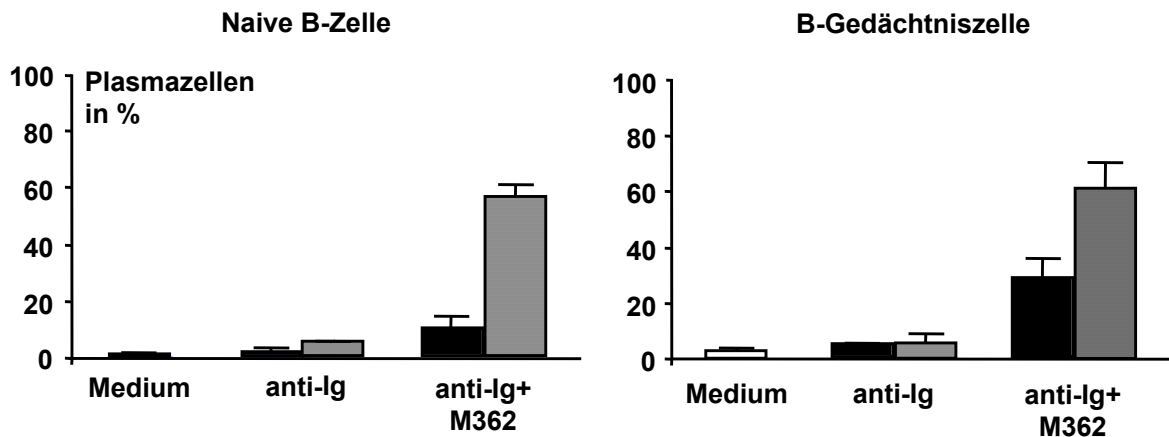


Abbildung 16 PDCs fördern die Plasmazelldifferenzierung von naiven und B-Gedächtniszellen. Aufgereinigte naive B-Zellen oder B-Gedächtniszellen (1×10^5 B-Zellen pro 200 μ l/well) wurden alleine (schwarze Balken: 1×10^5 B-Zellen pro 200 μ l/well) oder mit PDCs (gestreifte Balken: 1×10^4 PDC pro 200 μ l/well) inkubiert und mit ODN M362 (3 μ g/ml), anti-Ig (10 μ g/ml) oder einer Kombination aus ODN M362 und anti-Ig stimuliert. Nach 8 Tagen wurde die Frequenz an Plasmazellen (CD20⁺, CD38⁺) mit der Durchflusszytometrie bestimmt. (naive B-Zelle: Mittelwert \pm SEM von 8 unabhängigen Experimenten; B-Gedächtniszelle: 3 Experimente)

Die vermehrte Plasmazelldifferenzierung in den Kokulturen von PDCs und naiven B-Zellen bzw. B-Gedächtniszellen führte in der Folge auch zur Produktion beachtenswerter Mengen an Immunglobulinen. Zur Quantifizierung der sezernierten Immunglobulinmengen wurden die Überstände der Kokulturen am Tag 13 geerntet. Die Bestimmung der Immunglobuline IgG und IgM erfolgte nach dem Protokoll des entsprechenden ELISA-Kits. Beträchtliche Mengen an IgM wurden sowohl von naiven als auch von B-Gedächtniszellen sezerniert, allerdings nur unter der Voraussetzung, dass PDCs in Kokultur vorlagen. Der Nachweis von IgG in den Zellkulturüberständen war hingegen auf die Kokulturen mit B-Gedächtniszellen beschränkt (Abb. 17).

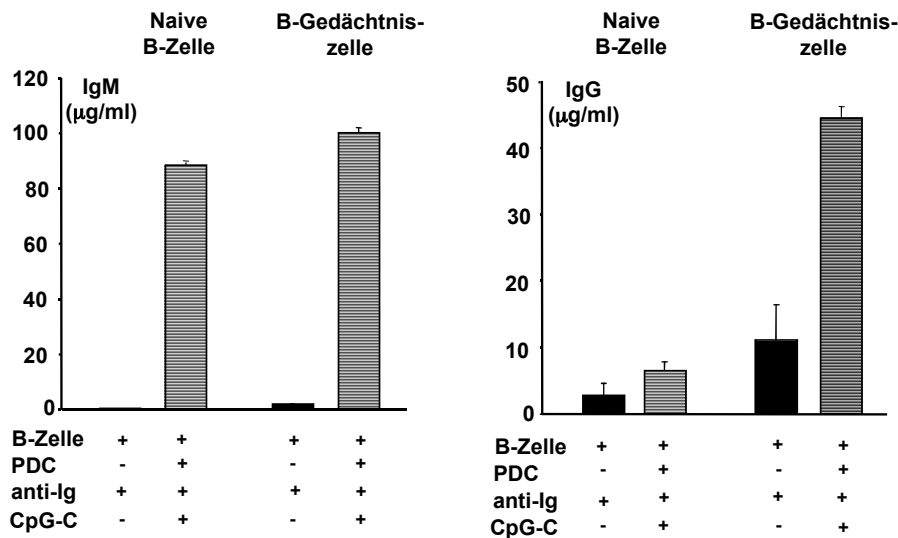


Abbildung 17 Produktion von IgM und IgG in den Kokulturen von PDCs mit naiven B-Zellen oder B-Gedächtniszellen. Aufgereinigte naive B-Zellen bzw. B-Gedächtniszellen (1×10^5 B-Zellen pro 200 µl/well) wurden alleine oder mit PDCs (1×10^4 PDCs pro 200 µl/well) inkubiert und mit anti-Ig (10 µg/ml) mit oder ohne ODN M362 (3 µg/ml) stimuliert. Nach 13 Tagen wurde in den Zellkulturüberständen im ELISA die Menge an IgM und IgG bestimmt. Es werden die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Zusammenfassend demonstrieren die Daten, dass die Stimulationskombination mit dem neuen ODN M362 und anti-Ig sowie die Zugabe der PDC zur B-Zellkulturen ausreichend ist, dass eine naive B-Zelle zur Plasmazelle differenziert, IgM produziert und sezerniert. Ein Immunglobulin-Klassenwechsel in der naiven B-Zelle, der sich in der Produktion von IgG widerspiegeln würde, kann in diesem Kultursystem nicht induziert werden.

III.2.3. Das von der PDC produzierte IFN α beeinflusst die B-Zellaktivierung und -differenzierung

Die nächste Fragestellung diente der Aufklärung des Mechanismus, auf dem der beobachtete Effekt der gesteigerten B-Zellaktivierung und -differenzierung beruht. Eine Kommunikationsmöglichkeit zwischen Zellpopulationen sind lösliche Faktoren. Ob IFN α ein entscheidender Faktor für die Interaktion B-Zelle/PDC darstellt, wurde in dem oben beschriebenen Kokultursystem durch Zugabe von blockierenden Antikörpern sowohl das löslich vorliegende IFN α/β (anti-IFN α 2500 U/ml, anti-IFN β 2000 U/ml) abgefangen als auch der IFN α/β -Rezeptor (5 µg/ml) blockiert. Die Blockade resultierte in einer 90%igen Reduktion des detektierbaren IFN α nach 72 Stunden (nicht gezeigte

Daten). Diese Versuchsreihe wurde mit Gesamt-B-Zellen und nicht mit den reinen Subpopulationen durchgeführt.

Wie in Abb. 18A/B dargestellt, führte die Blockade des löslichen Faktors $IFN\alpha$ zur Reduktion der Zytokinsekretion. Vor allem war die Sekretion von IL-10 in Abwesenheit von $IFN\alpha$ stark beeinträchtigt. Die gemessenen IL-10-Konzentrationen waren um mehr als 50% reduziert. Die detektierten IL-6-Mengen schienen hingegen nicht so stark von $IFN\alpha$ abhängig zu sein. Die ermittelten Plasmazellfrequenzen sind durch die Blockade und das Abfangen von $IFN\alpha/\beta$ ebenfalls gemindert (Abb. 18C). Diese Daten schreiben $IFN\alpha$ eine wesentliche Funktion in der Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen zu und unterstützen die bestehenden Literaturdaten, die IL-10 als ein wichtiges Zytokin im Differenzierungsprozess einer B-Zelle beschreiben.

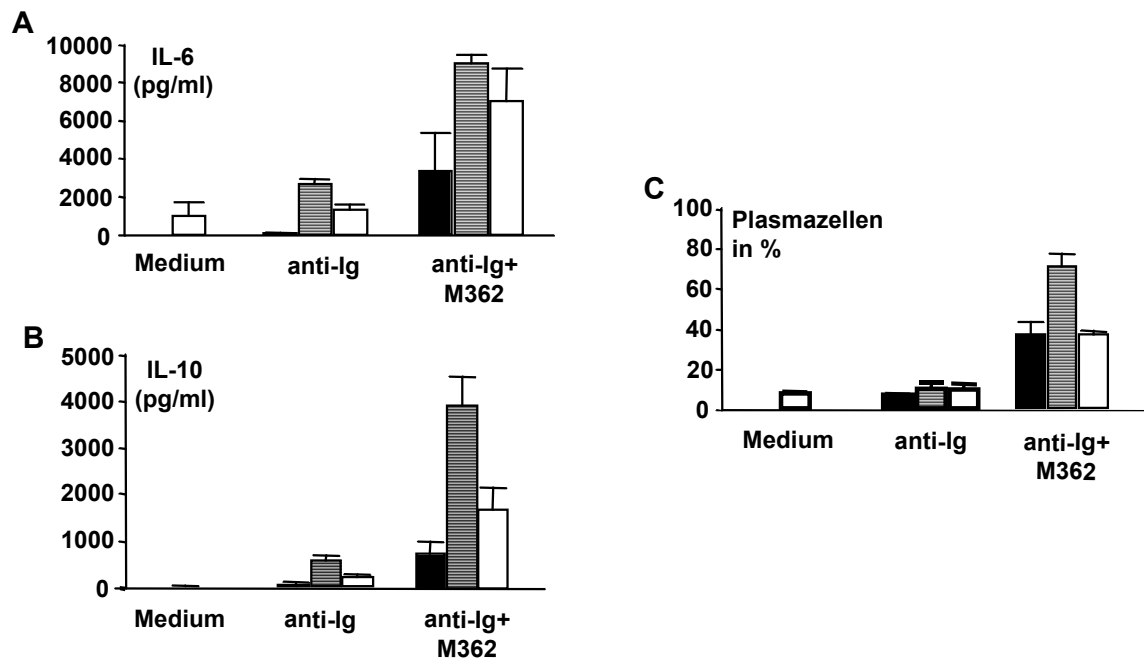


Abbildung 18 Blockade von $IFN\alpha$ führt zur Reduktion von IL-6, IL-10 und der Frequenz an Plasmazellen im Kokultursystem. B-Zellen (1×10^5 B-Zellen pro Bedingung) wurden alleine oder mit PDCs (1×10^4 PDCs pro Bedingung) inkubiert und mit ODN M362 (3 $\mu\text{g/ml}$), anti-Ig (10 $\mu\text{g/ml}$) oder einer Kombination aus ODN M362 und anti-Ig stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Konzentrationen von IL-6 (A) und IL-10 (B) in den Zellkulturüberständen mittels ELISA ermittelt. (C) Nach 8 Tagen wurde die Frequenz an Plasmazellen ($CD20^+$, $CD38^+$) mit der Durchflusszytometrie bestimmt. Es werden die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$) der Plasmazellhäufigkeit gezeigt. Die biologische Aktivität von Typ-I-IFN ($IFN\alpha$ und $IFN\beta$) wurde mit einer Kombination aus den Antikörpern anti- $IFN\alpha$ (2500 U/ml), anti- $IFN\beta$ (2000 U/ml) und anti- $IFN\alpha/\beta$ -Rezeptor (5 $\mu\text{g/ml}$) blockiert (schwarzer Balken: B-Zelle; gestreifter Balken: B-Zelle+PDC; weißer Balken: B-Zelle +PDC+Typ-I-IFN-Blockade).

III.2.4. IL-15 als Auslöser eines Isotyp-Switches?

Wie unter III.1.3 beschrieben wurde, konnte in der Kokultur von PDCs und naiven B-Zellen mit der kombinierten Stimulation anti-Ig und ODN M362 keine erwähnenswerten IgG-Mengen im Überstand detektiert werden. Welcher weiteren Zellpopulation oder welchem Zytokin bedarf es dem oben beschriebenen T-zellunabhängigen Kokultursystem zur Auslösung eines *Isotyp-Switch* zu IgG in der naiven B-Zelle. Die Literatur gibt Hinweise, dass die Population der myeloiden dendritischen Zellen (MDC) unter bestimmten Voraussetzungen einen Ig-Klassenwechsel - ohne Beteiligung einer T-Zelle - in der naiven B-Zelle induzieren kann [197]. Hieraus entstand die Idee einer „Dreiecksbeziehung“ zwischen B-Zelle, PDC und MDC, die einer naiven B-Zelle einen *Isotype-Switch* ermöglichen könnte.

Nachdem sich versuchstechnische Schwierigkeiten durch die gleichzeitige Aufreinigung von vier verschiedenen Zellpopulationen ergaben, wurden für Vorversuche, die lediglich zur Bestätigung unserer Hypothese dienen sollten, anstelle der MDC das Zytokin IL-15 (10 ng/ml) eingesetzt. IL-15 müsste unter den Bedingungen, die das Kokultursystem aus PDC und naiver B-Zelle schafft, von MDCs sezerniert werden.

Aufgrund der geringen Ausbeute an reinen Zellen und der wachsenden Anzahl von Versuchsbedingungen wurde die Zellanzahl bei gleichbleibendem Zellzahlverhältnis halbiert (5000 PDCs auf 50000 naive B-Zellen oder B-Gedächtniszellen). Aus diesem Grund wurden im Verhältnis zu den voran gezeigten Daten geringere Immunglobulinmengen gemessen. Ein direkter Vergleich der Resultate ist somit nicht möglich.

Als weiterer Stimulus ist R-848 (0,5 µg/ml) in die Versuchsreihe aufgenommen worden. R-848, ein synthetischer Ligand von TLR7, der, wie TLR9, sowohl von der B-Zelle als auch von der PDC exprimiert wird, zeigt ein vergleichbares Aktivierungsmuster zu CpG-ODN der Klasse C: R848 stimuliert die B-Zelle zur Proliferation und Differenzierung, allerdings nur in Anwesenheit von Typ-I-IFN [199], und induziert ebenfalls in der PDC beträchtliche Mengen an IFNα [198].

Der Versuchsaufbau wurde dahingehend modifiziert, dass jeweils eine Vergleichsbedingung mit IL-15 (10 ng/ml) angesetzt wurde. In Abb. 19 ist der Einfluss von IL-15 unter dem Stimulus ODN M362 auf die Plasmazelldifferenzierung dargestellt. Nach 8 Tagen Inkubation wurde die Plasmazellfrequenz mittels der FACS-Methode ermittelt. Allein durch die Zugabe von IL-15 zu den Kul-

turbedingungen mit naiven B-Zellen wurde die Frequenz an Plasmazellen stark erhöht (von 21% auf 57%). Der immense Anstieg der Plasmazellanzahl ist zu einem gewissen Prozentsatz auf die gesteigerte Proliferationsrate durch die Anwesenheit des Wachstumsfaktors IL-15 zurückzuführen; die vermehrte Proliferation stellt aber nur eine teilweise Erklärung für das gesehene Phänomen dar (Daten von Isabelle Ding). Mit der simultanen Zugabe von PDCs und IL-15 zur B-Zellkultur war die Plasmazellfrequenz auf den beachtlichen Wert von 84% gestiegen. Unter der Stimulation mit R848 wurden vergleichbare Plasmazellfrequenzen wie mit ODN M362 erzielt.

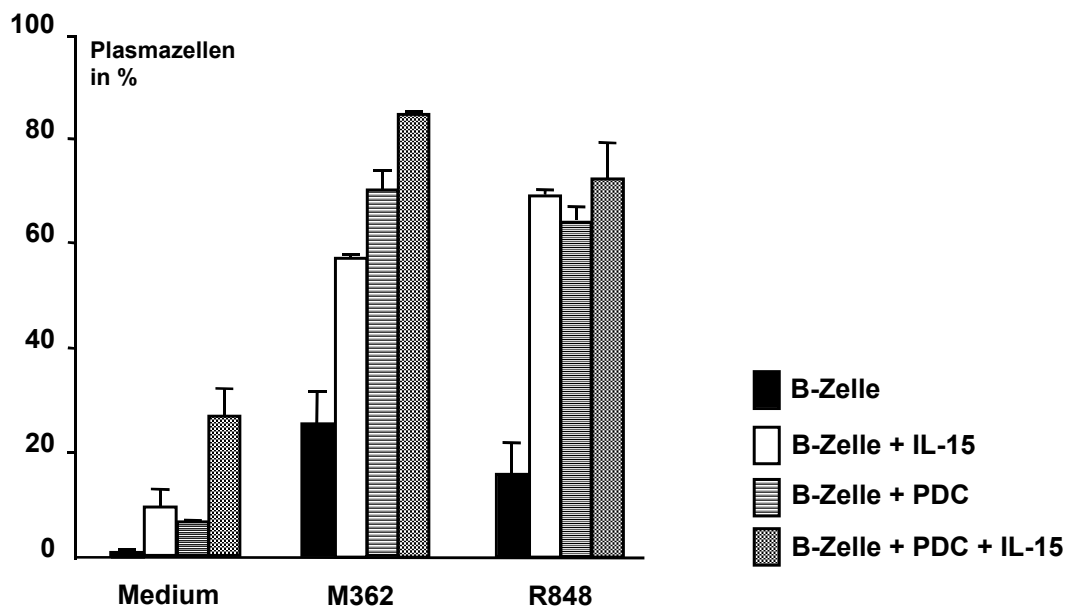


Abbildung 19 Die Plasmazelldifferenzierung der naiven B-Zelle wird durch die Anwesenheit von IL-15 stark gefördert. Aufgereinigte naive B-Zellen (5×10^4 B-Zellen pro 200 μ l/well) wurden alleine (schwarze Balken), unter Zugabe von IL-15 (10 ng/ml) (weiße Balken), mit PDCs (schwarz-weiß gestreifte Balken: 5×10^3 PDC pro 200 μ l/well) oder einer Kombination von PDCs und IL-15 (schwarz-weiß karierte Balken) inkubiert und mit ODN M362 (3 μ g/ml) oder R848 (0,5 μ g/ml) stimuliert. Nach 8 Tagen wurde die Frequenz an Plasmazellen (CD20⁺, CD38⁺) mittels der Methode der Durchflusszytometrie bestimmt. Der Mittelwert (\pm SEM) der Frequenz an Plasmazellen von 8 unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Eine beträchtliche Anzahl von Plasmazellen korreliert meist mit einer verstärkten Produktion von Immunglobulinen. In den Zellkulturüberständen nach 13tägiger Inkubationszeit konnten bemerkenswerte Mengen an IgM und zu unserer Überraschung auch IgG detektiert werden (Abb. 20). Folglich induzierte die Zugabe von IL-15 zu den Kokulturen die Sekretion des Immunglobulins IgG. Unerwartet war der Befund, dass die nachgewiesenen Ig-Konzentrationen unter der Stimulation mit R848 die Mengen an IgM und IgG, die durch ODN M362 induziert wurden, sogar noch übertrafen. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass IL-15 die Differenzierungsphase der naiven

B-Zelle beeinflussen kann. Die Frage, ob IL-15 einen Ig-Klassenwechsel auslösen kann, ist anhand dieser Datenlage jedoch nicht eindeutig zu beantworten.

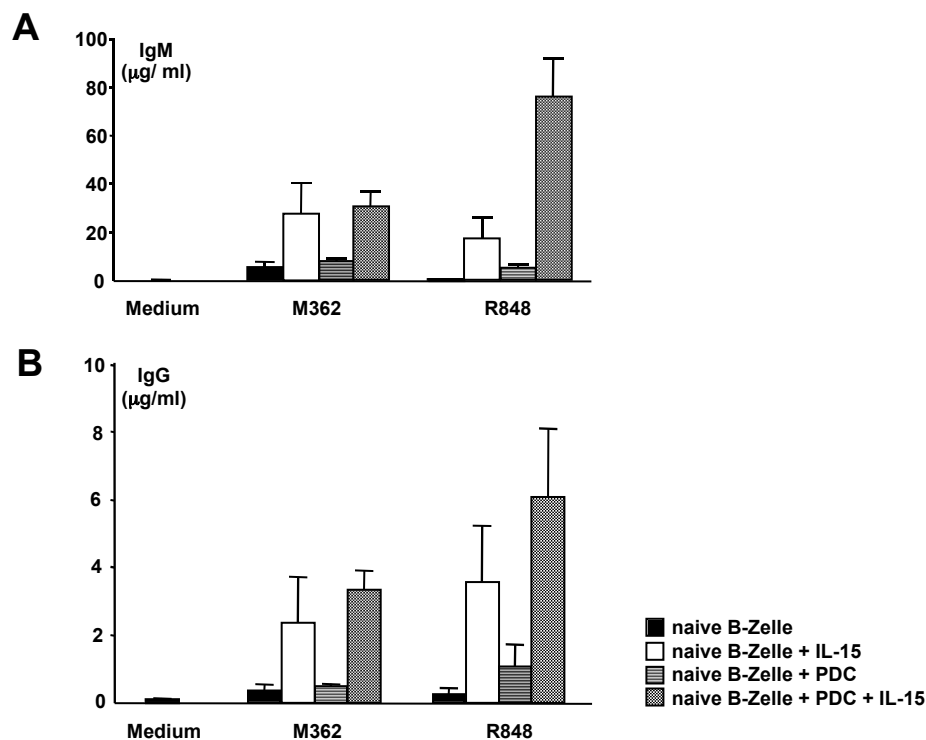


Abbildung 20 Die Anwesenheit von IL-15 in den Kokulturen induziert die Sekretion von IgG. Aufgereinigte naive B-Zellen (5×10^4 B-Zellen pro 200 μ l/well) wurden alleine (schwarze Balken), unter Zugabe von IL-15 (10 ng/ml) (weiße Balken), mit PDCs (schwarz-weiß gestreifte Balken: 5×10^3 PDC pro 200 μ l/well) oder einer Kombination von PDC und IL-15 (schwarz-weiß karierte Balken) inkubiert und mit ODN M362 (3 μ g/ml) oder R848 (0,5 μ g/ml) stimuliert. Nach 13 Tagen wurde in den Zellkulturüberständen im ELISA die Menge an IgM und IgG bestimmt. Es werden die Mittelwerte \pm SEM; n=4 gezeigt.

III.3. Gelatine-Nanopartikel

III.3.1. Beladung von Gelatine-Nanopartikel mit ODN M362 und ODN 2006 verstärkt lediglich einen Arm der immunstimulatorischen Aktivitäten von CpG-ODN

Es wurde jüngst veröffentlicht, dass die IFN α -induzierende Wirkungskomponente von CpG-ODN nicht ausschließlich Anforderungen an die primäre Basensequenz, sondern auch an die sich daraus ergebende Struktur stellt. Die Detektion beträchtlicher IFN α -Mengen in PDC-Kulturen nach Stimulation mit CpG-A-ODN wird in engen Zusammenhang mit der Ausbildung höhermolekularer, Partikel-ähnlicher Strukturen gebracht [206]. Mit welcher immunstimulatorischen Konsequenz ist in Anlehnung an die aufgestellte Hypothese einer Struktur-Wirkungsbeziehung zu rechnen, wenn ODN der CpG-Klasse B und C, die unter physiologischen Bedingungen in monomerer oder dimerer Form (III.1.4) vorliegen, eine Partikel-ähnliche Struktur verliehen wird. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die jeweiligen CpG-Oligonukleotide an die positivierete Oberfläche von Gelatine-Nanopartikel über ionische Wechselwirkungen gebunden.

In dieser Versuchsreihe wurden die naiven Gelatine-Nanopartikel in zwei unterschiedlichen Größen eingesetzt; sie hatten entweder einen Durchmesser von 160 oder 300 nm. Eine homogene Größenverteilung konnte durch den Herstellungsvorgang (I.4.4) sichergestellt werden. Die eingesetzte Menge an CpG-ODN zur Beladung der Nanopartikel war mit 5% so gewählt und optimiert, dass die zugegebene Menge an ODN zu 100% gebunden wurde und kein Überschuss an freiem ODN im Überstand der Nanopartikeldispersion nachweisbar war. Nicht an Nanopartikel adsorbierte CpG-ODN-Monomere könnten die im Folgenden vorgestellten Beobachtungen verfälschen, da sie bei Einsatz einer Dispersion mit CpG-beladenen Nanopartikeln am TLR9 antagonistische Wirkung zeigen [304].

Innerhalb von PBMCs wurde die Produktion von IFN α durch Adsorption der CpG-ODN 2006 und M362, die als alleinige Stimulationsquelle schwache bzw. mittelmäßige IFN α -Induktoren darstellen, an die positiv geladene Oberfläche von Gelatine-Nanopartikel signifikant gesteigert (Abb. 21). Der IFN α -induzierende Effekt von CpG-C konnte durch die Adsorption an Gelatine-Nanopartikel verdoppelt werden, CpG-B-ODN gebunden an Nanopartikel führten erstmals zu einer messbaren Produktion von IFN α . Die detektierten IFN α -Konzentrationen waren beachtlich und erreichten je nach ursprünglicher Nanopartikelgröße nahezu die Mengen an IFN α , die mit der Positivkontrolle

CpG-A-ODN erzielt werden. Das Vermögen von ODN 2216, IFN α zu induzieren, war durch die Kopplung an Gelatine-Nanopartikel im Vergleich zur ungebundenen Form stark herabgesetzt.

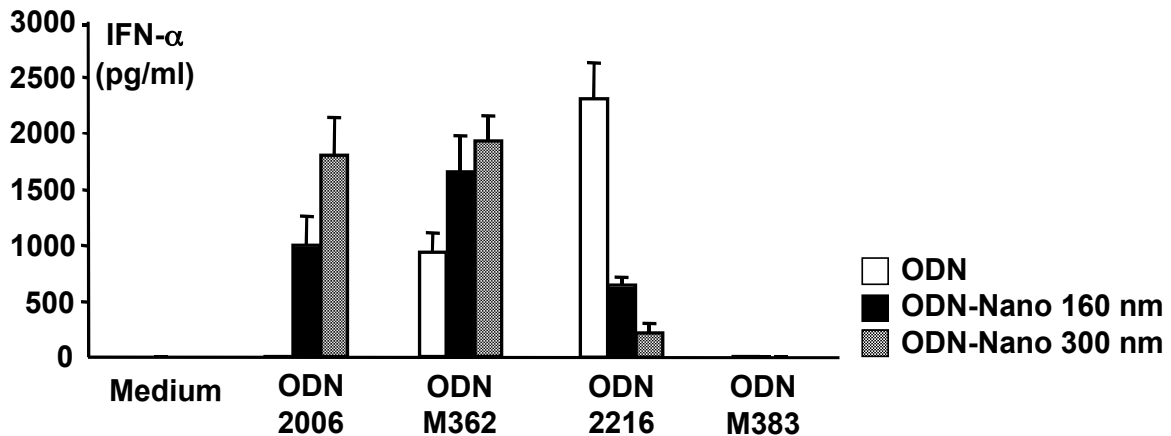


Abbildung 21 Verstärkte Induktion von IFN α in humanen PBMCs durch CpG-Oligonukleotide, die an Gelatine-Nanopartikel gebunden sind. PBMCs (4×10^5 PBMCs/well) wurden mit Gelatine-Nanopartikel, die jeweils mit einem Hauptvertreter der 3 CpG-ODN-Klassen (ODN 2006, ODN M362, ODN 2216) beladen wurden, inkubiert. Als Kontrolle wurden PBMCs angesetzt, die nur mit dem jeweiligen CpG-ODN alleine ($3 \mu\text{g/ml}$) inkubiert wurden. Die Nanopartikel waren 5%ig mit CpG-ODN beladen und die Nanopartikel-CpG-ODN-Dispersion wurde entsprechend einer Konzentration von $3 \mu\text{g ODN/ml}$ eingesetzt. Es wurden zwei verschiedene Größen an Gelatine-Nanopartikel (160 nm und 300 nm) zum Vergleich mit CpG-Oligonukleotiden beladen. Nach 48 Stunden wurde in den Zellkulturüberständen die Konzentration von IFN α im ELISA gemessen. Es werden die Mittelwerte \pm SEM von acht unabhängigen Experimenten gezeigt.

Die Sequenzspezifität wurde durch die Formulierung nicht modifiziert: die korrespondierende GC-Kontrolle (M383) zu M362 konnte weder in monomerer Form noch gebunden an Nanopartikel eine detektierbare IFN α -Synthese in PBMCs induzieren. Dies bestätigt nochmals, dass der Stimulus, der die Sekretion von IFN α in PDCs auslöst, in seiner Sequenz CpG-Motive zur Immunstimulation einschließen muss und dass die eingesetzten, nativen Gelatine-Nanopartikel isoliert über keine intrinsische, IFN α -induzierende Aktivität verfügen. In den Folgeversuchen diente ODN M383 als Negativkontrolle, da native Gelatine-Nanopartikel aufgrund der fehlenden Absättigung ihrer positiven Oberflächenladung mit anionischen CpG-Oligonukleotiden mit der Zellmembran interagieren und zum Tod der betreffenden Zelle führen würden. Auffällig war der signifikante Unterschied in den detektierten IFN α -Mengen in Abhängigkeit von der eingesetzten Partikelgröße. Die Nanopartikel mit einer durchschnittlichen Größe von 300 nm waren den kleineren Nanopartikeln mit 160 nm in der Induktion von IFN α weit überlegen.

Zur Nachweisführung, dass die immunstimulatorischen ODN in ungebundener Form und die an Nanopartikel gebundenen ODN die gleichen Zellpopulationen aktivieren, wurden die gerade beschriebenen Versuche mit isolierten PDCs wiederholt. Die Steigerung der IFN α -Synthese durch die Formulierung von CpG-B- oder CpG-C-ODN konnte auf reinen PDCs bestätigt werden (Abb. 22). Auch das auf PBMC-Ebene gesehene IFN α -Muster für das CpG-A-ODN 2216 und das Kontroll-ODN M383 konnte auf höherem Niveau reproduziert werden. In Abhängigkeit von der durchschnittlichen Größe der eingesetzten Nanopartikel (160 oder 300 nm) hat die im Überstand nachgewiesene Konzentration an IFN α die Menge, die durch die Positivkontrolle ODN 2216 induziert wird, sogar übertroffen.

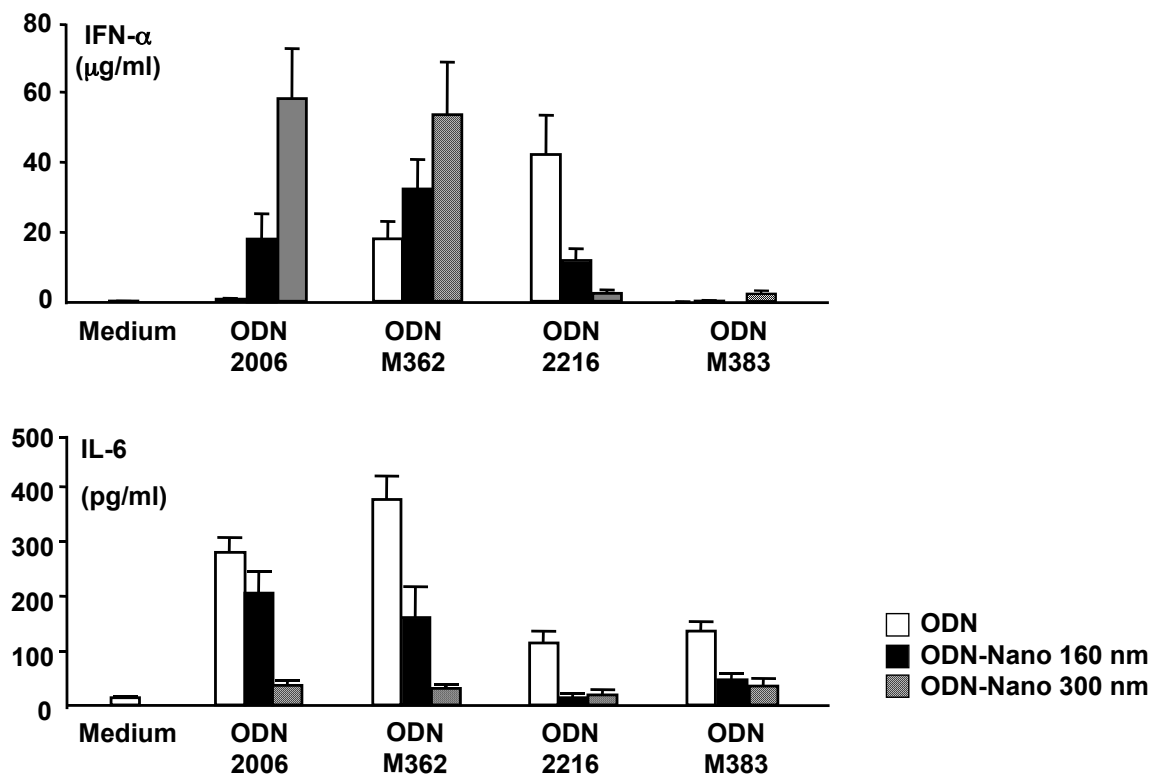


Abbildung 22 Mit CpG-Oligonukleotid beladene Nanopartikel zeigen eine immunstimulatorische Aktivität auf PDCs, B-Zellen sind jedoch inert. Mit der MACS-Technologie aufgereinigte Gesamt-B-Zellen (2×10^5 B-Zellen/well) oder PDCs (5×10^4 PDCs/well) wurden mit $3 \mu\text{g/ml} \pm$ Gelatine-Nanopartikel (160 bzw. 300 nm) für 48 Stunden in Kultur gegeben. In den Überständen der PDC-Kulturen wurde IFN α , in den B-Zell-Kulturüberständen das Zytokin IL-6 bestimmt. Die gezeigten Daten stellen die Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Experimenten dar.

Von CpG-ODN der Klasse B und C ist bekannt, dass sie B-Zellen direkt aktivieren können: B-Zellen beginnen zu proliferieren und sezernieren nach Stimulation mit CpG-ODN als erstes das Zytokin IL-6. Als Nachweis für eine frühe B-Zellspezifische Aktivierung wurde die Sekretion von IL-6 nach Stimulation mit CpG-ODN beladenen Nanopartikeln herangezogen. Unvorhergesehen reagierten B-Zellen, im Vergleich zu PDCs, nicht mit einer gesteigerten immunstimulatorischen Aktivität nach Kultivierung mit CpG-Oligonukleotid beladenen Nanopartikeln (Abb. 22). Gegenüber den großen mit CpG-ODN beladenen Nanopartikeln waren die B-Zellen nahezu inert; die detektierten IL-6-Konzentrationen waren mit denen der Mediumkontrolle vergleichbar. Die immunstimulatorischen Effekte von CpG-ODN auf B-Zellen konnten durch die Bindung an Nanopartikel nicht potenziert werden.

Zusammengefasst scheinen Gelatine-Nanopartikel, die mit Vertretern der CpG-B- oder CpG-C-Klasse beladen sind, die immunstimulatorische Aktivität von CpG-A-ODN, wie angenommen, zu imitieren. Zusätzlich betonen die gezeigten Daten die Selektivität der Formulierung zur Aktivierung der plasmazytoiden dendritischen Zelle. Hingegen zeigte die B-Zelle gegenüber dieser „Verpackungsform“ des CpG-ODN keine Sensitivität.

IV. Diskussion

IV.1. Identifizierung einer neuen CpG-Oligonukleotidklasse

In der hier vorliegenden Arbeit wurden CpG-ODN-Sequenzen identifiziert, die starke Effekte auf beide humane TLR9-tragende Zellpopulationen zeigen. Diese neue Klasse von stimulatorischen CpG-Oligonukleotiden, die CpG-C getauft wurde, überschreitet in ihrem Aktivitätsmuster die Grenzen, die für die beiden bereits etablierten CpG-ODN-Klassen beschrieben wurden, dahingehend, dass sie sowohl einen optimalen Stimulus für B-Zellen darstellt als auch simultan plasmazytoide dendritische Zellen aktiviert, große Mengen an IFN α zu sezernieren.

Die Klassifizierung unterschiedlicher CpG-Oligonukleotide sollte auf spezifischen Populationen von Immunzellen beruhen, die aufgrund der Expression des korrespondierenden Rezeptors TLR9 kompetent sind, das CpG-Motiv zu erkennen. Als Konsequenz kann im humanen Immunsystem eine Einteilung der verschiedenen CpG-ODN-Klassen auf der Basis von immunologischen Effekten auf B-Zellen und PDCs, die einzigsten Immunzellen im peripheren Blut des Menschen, die TLR9 exprimieren, vorgenommen werden. Entsprechend dem Umfang der IFN α -Induktion wurde für CpG-ODN bereits eine Einteilung in zwei Gruppen beschrieben: CpG-A (starke Induktion von IFN α in PDCs, der Aktivierungsgrad von B-Zellen wurde bislang nicht eindeutig festgelegt) und CpG-B (sehr schwacher IFN α -Induktor, starker Aktivator von B-Zellen) [116]. Allerdings erfordert eine graduelle Differenzierung der IFN α -Induktion durch unterschiedliche CpG-Sequenzen eine festgelegte Grenzkonzentration. Wir halten es deshalb für sinnvoller und in der Praxis besser umsetzbar, eine Einteilung nach unterschiedlichen, funktionellen Aktivitäten der CpG-sensitiven Zellpopulationen vorzunehmen.

IV.1.1. Charakteristische Eigenschaften von CpG-C-Oligonukleotiden

In der hier beschriebenen Studie wurde eine Reihe von CpG-Oligonukleotidsequenzen identifiziert, die die funktionellen Aktivitäten beider bislang existierenden CpG-Hauptklassen in sich vereinen: der Prototyp dieser neuen CpG-C-Klasse, M362, induziert die Aktivierung von B-Zellen, die an der Expression kostimulatorischer Moleküle CD80/CD86/CD40 festgemacht werden kann (nicht gezeigte Daten) und fördert die Sekretion des B-Zellspezifischen, proinflammatorischen Zytokins IL-6. Das neue Panel an CpG-ODN-Sequenzen ist in der Stimulation von B-Zellen in gemischten

Zellkulturen den Vertretern der CpG-Klasse A und B überlegen. Die Prävalenz beruht einerseits auf einer direkten Aktivierung, andererseits auf einer indirekten B-Zellaktivierung, die über die PDC vermittelt wird.

Im Gegensatz zu den Vertretern der CpG-B-Klasse zeigen die Sequenzen, die der neuen Klasse zuzuordnen sind, aber auch eine den CpG-A-ODN vergleichbare Aktivität; sie besitzen ebenfalls das Vermögen, große Mengen an IFN α in der PDC zu induzieren. Dies demonstriert, dass nicht nur die Vertreter der CpG-A-Klasse große Mengen an IFN α bewirken können, eine Beobachtung, die erstmals von T. Tokunaga und seiner Arbeitsgruppe gemacht wurde [102]. Sie zeigten, dass Phosphordiester-Oligonukleotide (PO-ODN) mit entsprechenden palindromischen, CpG-haltigen Hexameren Typ-I-IFN in humanen PBMCs induzieren können. Jedoch lösen die von Tokunaga beschriebenen Sequenzen keine IFN α -Expression mehr aus, sobald ihr Rückgrat modifiziert wurde und die Sequenz als Nuklease-resistentes Phosphorthioat-ODN (PS-ODN) vorliegt [117].

Die neuen CpG-Oligonukleotidsequenzen werden über folgende gemeinsame Sequenzelemente charakterisiert:

1. mehrere TCG-Trinukleotide am oder in unmittelbarer Nähe zum 5'-Ende des Oligonukleotids,
2. eine zentrale Palindromsequenz, die immunstimulatorische CG-Dinukleotide einschließt, und
3. mit einem kompletten Phosphorthioat-Rückgrat ausgestattet ist.

Interessant ist, dass bei Einhaltung der drei genannten Voraussetzungen - ein 5'-TCG, mehrere CG-Dinukleotide innerhalb einer palindromischen Sequenz sowie ein komplett modifiziertes Rückgrat - bereits alle Anforderungen, die an die Sequenzen der neuen CpG-ODN-Klasse gestellt sind, erfüllt sind. Das Sequenzmotiv am 3'-Ende des Palindroms scheint dagegen einen geringen Einfluss auf die Aktivität zu besitzen, da eine Modifikation mit Einführung eines zusätzlichen CG-Dinukleotids oder die Entfernung des überhängenden 3'-Endes keine Veränderung der immunstimulatorischen Aktivität zur Folge hatte (M387, M388). Die umfassende Bedeutung des „TCGTCG“-Motivs am 5'-Ende der Sequenz wird durch das Kontroll-ODN M384 bestärkt. ODN M384, bei dem der erste Sequenzabschnitt im Vergleich zu M362 durch „TGCTCG“ ausgetauscht ist, d.h. das erste stimulatorische CG-Dinukleotid fehlt, zeigt eine signifikante Abnahme in der Fähigkeit, IFN α zu induzieren. Auch allein die Verschiebung des ersten CpG-Dinukleotids schrittweise vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende einer CpG-C-ODN-Sequenz verringert die IFN α -induzierende Aktivität zunehmend [200, 201]. Demnach scheint die Erkennung des CpG-ODN über das 5'-Ende zu erfolgen

und die Anwesenheit eines CpG-Motivs in dieser Region für die immunstimulatorische Aktivität mitentscheidend zu sein.

Diese Annahme wird durch die herausragende Arbeit von S. Agrawal und seinen Mitarbeitern, die ein weites Spektrum von chemischen Modifikationen an Oligonukleotid-Sequenzen einschließt, bestätigt. Hierzu zählten Modifikationen des Rückgrates [202], des Deoxyribose-Rings, der einzelnen Nukleotide [203] sowie auch die Markierung [204] oder Verlinkung [205] von ODN-Sequenzen. Diese Daten führten zu dem Ergebnis, neben weiteren interessanten Befunden, dass 5'-Modifikationen einen negativen Effekt auf die immunstimulatorische Aktivität besitzen, Modifikationen am 3'-Ende hingegen einen unbedeutenden Einfluss auf die Aktivität immunstimulatorischer Oligonukleotide ausüben. Diese Befunde stellen gleichfalls die Bedeutung des 5'-Endes einer stimulatorischen ODN-Sequenz in den Vordergrund. Folglich ist neben der primären Sequenz, wie hier gezeigt, auch eine freie Zugänglichkeit des 5'-Endes für die Rezeptorerkennung von CpG-Oligonukleotiden ausschlaggebend.

Das zweite charakteristische Sequenzelement für die CpG-C-Klasse ist ein Palindrom, welches CG-Dinukleotide umfassen sollte. Die palindromische Sequenz stellt die Voraussetzung für die Ausbildung eines partiellen Doppelstranges oder einer *Hairpin*-Struktur dar [206]. In einer vor kurzem veröffentlichten Studie wird einer Doppelstrangbildung große Bedeutung bei dem Aufnahme- und dem Erkennungsprozess zugesprochen. Bei Kontrolloligonukleotiden, denen aufgrund einer N3-Methylierung am Thymidin eine Duplexbildung verwehrt wird, war mit einem starken Aktivitätsverlust verbunden [207]. Dies wurde in murinen Makrophagen gezeigt, ist aber in Teilen auf die IFN α -induzierende Kapazität von CpG-C-ODN im humanen System übertragbar. Das Kontrolloligonukleotid M386, das keinen selbstkomplementären Bereich in seiner Sequenz beinhaltet, zeigte eine 60%ige Reduktion in seiner immunstimulatorischen Aktivität.

Diese Ergebnisse verleiten zu der Behauptung, dass *Toll-like*-Rezeptoren für die Aufnahme und/oder für die Auslösung einer bestimmten Signaltransduktion sowohl einen CpG-reichen 5'-Terminus als auch eine Duplexstruktur fordern. Die Notwendigkeit der Erkennung von zwei Sequenzmotiven gleichzeitig, neben den immunstimulatorischen CpG-Motiven, steigert einerseits die Selektivität, andererseits verhindert es die versehentliche Erkennung von Wirts-DNA. Eine Selektivität ist schwer zu garantieren, wenn der Erkennungsmechanismus lediglich auf einer Säule, den immunstimulatorischen CpG-Dinukleotide, beruhen würde, die zwar mit einer unbeträchtlichen Häufigkeit, aber dennoch in der Wirts-DNA vorkommen.

Die geringere Gewichtung des 3'-Endes einer immunstimulatorischen DNA-Sequenz bezeugen neben den hier gezeigten Daten Immunomere, die durch die Verknüpfung zweier CpG-Oligonukleotide über ihre Sequenzenden entstehen und infolgedessen entweder über zwei freie 5'- oder 3'-Enden verfügen. Ein 5'-5'-verknüpftes Immunomer, das für die Interaktion mit dem Rezeptor zwei 3'-Enden zur Verfügung stellen kann, zeigt im Vergleich zu einem monomeren CpG-ODN keine immunstimulatorische Aktivität [208]. Des Weiteren beeinflusst die Konjugation von funktionellen Liganden am 3'-Ende des CpG-ODN, die der Stabilität gegenüber 3'-Exonukleasen dient, die immunstimulatorische Aktivität nicht, zeigen aber den Vorteil einer gesteigerten metabolischen Stabilität *in vivo* [209, 210].

Wir konnten drei charakteristische Sequenzelemente der CpG-C-Klasse sowie deren Lokalisation innerhalb einer Oligonukleotidsequenz erarbeiten. Interessant ist beim Vergleich der von uns beobachteten Daten mit der bestehenden Literatur, dass bei der Untersuchung von CpG-ODN, die in ihrer Basenzusammensetzung und folglich auch in ihrem Aktivitätsmuster stark von CpG-C-ODN abweichen, immer die Bedeutung eines 5'-Endes sowie einer zentralen Sequenz für die immunstimulatorische Aktivität hervorgehoben wird, hingegen dem 3'-Ende eine geringe Relevanz für die Aktivität zugesprochen wird. Dieser Befund gibt Hinweise, dass TLR9, als Erkennungsrezeptor für CpG-DNA, die CpG-Sequenz höchstwahrscheinlich vom 5'- zum 3'-Ende abliest und eine bestimmte Sekundärstruktur bedingt durch eine ausgewählte, zentrale Basenkonstellation für eine erfolgreiche Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip benötigt wird.

IV.1.2. Vergleich des Prototyps M362 mit Vertretern von CpG-A und CpG-B

Ein charakteristisches Sequenzelement der Vertreter der CpG-A-Klasse, Prototyp 2216, ist eine zentrale Palindromsequenz, die mehrere CG-Dinukleotide aufweist. Ein weiteres Schlüsselement sind vier aufeinanderfolgende Guanosine (PolyG) sowohl am 3'- als auch am 5'-Sequenzende. Der im Kern der Sequenz vorliegende selbstkomplementäre Bereich kann zu einer doppelsträngigen Struktur über Watson-Crick-Basenpaarung hybridisieren, die PolyG-Motive führen zusätzlich zur Ausbildung von intermolekularen Verknüpfungen. Für Oligonukleotide, die mindestens vier Guanosine in Folge aufweisen, ist bekannt, dass sie sogenannte Quadruplex-Strukturen über Guanin-Guanin-Hoogsten-Basenpaarung ausbilden, die G-Tetraden bezeichnet werden [211, 212]. Dadurch entstehen höhermolekulare, sekundäre und tertiäre Strukturen unterschiedlicher Größe und Form, die die immunstimulatorische Aktivität von CpG-A, die Induktion von IFN α , garantieren. Modifikationen, wie der Austausch des PolyG-Motivs durch PolyCs oder

die teilweise Zerstörung des Palindroms durch Basenaustausch, verhindern die Ausbildung höhermolekularer Strukturen, was das vollständige Ausbleiben einer IFN α -Sekretion zur Folge hat [100, 206]. Hingegen ist die Ausbildung von höheren Strukturen, die sich vor allem über die Verknüpfung der PolyG-Enden erklären lassen, für CpG-C-ODN im Vergleich zu den Vertretern der CpG-A-Klasse zur Induktion von IFN α in PDCs nicht entscheidend.

Des Weiteren zeigt ODN 2216 seine IFN α -induzierende Kapazität ausschließlich unter der Voraussetzung, dass die Sequenz über ein chimäres Rückgrat verfügt. Die Nukleotide im Zentrum der Sequenz 2216 sind über unmodifizierte Phosphodiester-Bindungen verknüpft, die den zentralen Bereich flankierenden Basen am 3'- und 5'-Ende sind über Phosphorthioate verbunden. Bei Modifikation des chimären Rückgrats zu einem kompletten Phosphorthioat-Rückgrat verliert CpG-A seine immunstimulatorische Aktivität [100]. Die neuen CpG-C-Sequenzen hingegen stellen nicht den Anspruch eines chimären Phosphodiester-Phosphorthioat-Rückgrates, sondern sind alle mit einem kompletten Phosphorthioat-Rückgrat „ausgestattet“, das bei einer *in vivo*-Applikation den Vorteil der Resistenz gegenüber Nukleasen bietet und somit eine verlängerte Halbwertszeit begünstigt [213]. Eine B-Zellaktivierung durch Phosphorthioat-Oligonukleotide unabhängig von ihrer DNA-Sequenz, wie von der Arbeitsgruppe um Pisetsky beschrieben [214], kann bei den Sequenzen der CpG-C-Klasse ausgeschlossen werden. Das Kontrolloligonukleotid M383, bei dem alle CG durch GC-Dinukleotide ersetzt wurden, belegt, dass ein Phosphorthioat-Rückgrat allein ohne immunstimulatorische CpG-Motive keine Hintergrundaktivität zeigt.

Offensichtlich senden CpG-C-Oligonukleotide abweichende Signale an PDCs als die, die von CpG-A-Oligonukleotiden ausgehen. Die Prototypen beider CpG-Klassen, 2216 und M362, erzielen eine hohe IFN α -Sekretion und fördern vergleichbar das Überleben von PDCs. Allerdings übertrifft CpG-C in der Aktivierung der PDC die Stimulationskraft von 2216 (nicht gezeigte Daten). Der Stimulus CpG-A ist bezüglich der Expression der Aktivierungsmarkern CD80/CD86 vergleichbar mit einer nicht-CpG-haltigen Negativkontrolle [100], was zu der Schlussfolgerung führt, dass CpG-A-ODN PDCs auf anderem Wege im Vergleich zu CpG-C- und CpG-B-ODN aktivieren. Weiterhin konnte von der Arbeitsgruppe um J. Marshall beobachtet werden, dass bei Zugabe höherer Konzentrationen an CpG-C zu einer Zellkultur als die optimal ermittelte Dosis die IFN α -Sekretion abrupt eingestellt wird. Hingegen endet die Kurve einer IFN α -Antwort, die durch CpG-A hervorgerufen wird, in einer Plateauphase und unterliegt keinem negativen Rückkoppelungsmechanismus [215]. Die Existenz von zwei unterschiedlichen, regulatorischen *Pathways* für die Synthese von Typ-I-IFN in humanen PDCs - in Abhängigkeit von der Aktivierung eines IFN-Rezeptor-vermittelten *feedback-loops* - wurde vor kurzem auch von unserer Arbeitsgruppe für CpG-A- und

CpG-B-ODN belegt [37]. Die Ungleichheit in der IFN α -Antwort, die durch die Vertreter der zwei ODN-Klassen hervorgerufen wird, in Verbindung mit der abweichenden Kompetenz, den DC-Reifungsprozess auszulösen, indiziert, dass CpG-A und CpG-C qualitativ unterschiedliche Signale an die PDC senden. Bei Erörterung der Ursachen für die Differenzen im Aktivitätsmuster ist auch das Vermögen zur Ausbildung von sekundären Strukturen zu berücksichtigen.

Mit den Sequenzen der CpG-B-Klassen haben die Vertreter von CpG-C neben dem komplett modifizierten Phosphorthioat-Rückgrat folgende Gemeinsamkeiten. Ein Sequenzelement, das sich allen neuen Oligonukleotide mit CpG-B teilen, ist ein „TCGTCG“-Motiv am 5'-Ende der Sequenz. Ein weiteres charakteristisches Merkmal der meisten aktiven humanen CpG-B-ODN ist der Einschluss von einer oder mehreren Kopien des „humanen“ CpG-Motivs 5'-GTCGTT-3' [95, 110]. Es war bei der Auswertung der hier beschriebenen Studie interessant, dass die aktivste Sequenz der neuen Gruppe von CpG-ODN, M362, ebenso auf das 6-Basen-lange CpG-Motiv „GTCGTT“ nicht verzichtet.

Die neue Gruppe von CpG-ODN löste innerhalb von PBMCs eine stärkere Aktivierung (vermehrte Expression kostimulatorischer Moleküle CD80/86 und gesteigerte Sekretion von IL-6) von B-Zellen als die Vertreter von CpG-B aus. Dieser zusätzliche Effekt der neuen ODN-Sequenzen im Vergleich zu CpG-B war aufgehoben, sobald die Population der PBMCs von PDCs depletiert wurde. Diese Ergebnisse betonen, dass die direkte Aktivierungsweise von B-Zellen über einen indirekten Aktivierungsweg, der über die PDC vermittelt wird, potenziert wird. Als Konsequenz sind die Vertreter der neuen CpG-ODN-Klasse, die eine Kombination von direkter und indirekter Aktivierung von B-Zellen ermöglicht, sowohl CpG-A-ODN, denen eine direkte B-Zellaktivierung vorenthalten ist, als auch CpG-B-ODN, die schwache IFN α -Induktoren darstellen, in Anbetracht der B-Zellstimulation überlegen.

IV.1.3. Vergleich mit anderen Vertretern der ODN-Klasse C

Nahezu gleichzeitig wurde von zwei weiteren Arbeitsgruppen ebenfalls die neue CpG-Oligonukleotid-Klasse C beschrieben [215, 216].

ODN M362:	5` TCG <u>TCG TCG TTC</u> : <u>GAA CGA CGT</u> TGA T 3` (25 Basen)
ODN 2395 [216]:	5` TCG TCG TTTT <u>CGGCGC</u> : <u>GCGCCG</u> 3` (22 Basen)
ODN C274 [215]:	5` TCG <u>TCG AAC</u> : <u>GTT CGA</u> GAT GAT 3` (21 Basen)

Beim ersten visuellen Vergleich der Prototypen ist nicht erkennbar, dass alle drei Sequenzen einer CpG-Oligonukleotidklasse angehören. Dies ist ein Hinweis, dass die hier vorgestellten Sequenzen nur eine kleine Auswahl von vielen möglichen Sequenzen mit verwandtem immunstimulatorischem Aktivitätsmuster bieten.

Bei genauer Betrachtung stellt man fest, dass die von uns formulierten, relevanten Sequenzelemente für CpG-C auch in den Sequenzen der beiden anderen Prototypen 2395 und C274 vorkommen. Ergänzende Informationen zu den CpG-C-spezifischen Sequenzkomponenten, die von den anderen Forschungsgruppen erarbeitet wurden, können gleichfalls auf den Prototyp M362 angewendet werden.

Für die immunstimulatorische Aktivität von ODN 2395 ist ein hexameres CpG-Motiv 5`-TCGTCGTT-3, das über einen PolyT-Abstandshalter an eine GC-reiche palindromische Sequenz knüpft, maßgeblich. Eine Vielzahl von Modifikationen, die den selbstkomplementären Sequenzabschnitt in seinem Umfang nicht beeinträchtigen dürfen, werden toleriert: ein partieller Austausch von Guanin/Cytosin durch Adenin/Thymidin innerhalb der Palindromsequenz beeinflusst bei Erhalt der gleichen Palindromlänge die Aktivität nicht [216]. Die durch gezielten Austausch der Nukleotide entstandenen Sequenzen zeigen große Ähnlichkeit zur Sequenz M362.

Wie von uns gleichfalls beobachtet, hat die Position des Palindroms bei Wahrung eines freien 5'-TCG-Terminus innerhalb bestimmter Grenzen keinen Einfluss auf die IFN α -induzierende Aktivität. Von Vollmer et al. wurde für die palindromische Einheit eine Mindestlänge von 6 komplementären Basen festgelegt, bei Unterschreitung dieser Grenze verringert sich das Aktivierungspotential stark, was im engen Zusammenhang mit der Ausbildung einer sekundären Struktur steht. Jüngst wurde dieser Befund von einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt: eine optimale IFN α -induzierende Aktivität kann mit längeren palindromischen Sequenzen, die mit einer erhöhten Stabilität der doppelsträngigen Struktur korrelierbar ist, erzielt werden. Dies indiziert die Präferenz für partiell doppelsträngige Oligonukleotide zur Aktivierung des Signalweges für die Produktion von IFN α [217]. Des Weiteren kann die immunstimulatorische Aktivität nur bei Verknüpfung der entscheidenden Sequenzkomponenten, Palindrom und 5'-TCG-Ende, gewährleistet sein [216]. Dieser Befund bietet eine Erklärung für das Ausbleiben einer signifikanten IFN α -Produktion nach Stimulation von PDCs mit dem ODN 2006: allein das Vorhandensein einer 5'-TCG-Sequenz in Abwesenheit eines Palindroms ist folglich zur Induktion von IFN α nicht ausreichend.

Die Arbeitsgruppe um J. Vollmer konnte neben der genauen Lokalisation der palindromischen Teilsequenz zusätzlich eine optimale Nukleotidabfolge innerhalb des selbstkomplementären Bereichs definieren. Die palindromische Region, die mindestens 10-12 Basen umfassen sollte, sollte in ihrer Sequenz mindestens zwei CG-Dinukleotide aufweisen, die vorzugsweise ein bis drei Basen Abstand voneinander haben. Sequenzen, bei denen die immunstimulatorischen CG-Dinukleotide jeweils durch vier Nukleotide getrennt sind, führen überraschenderweise zu einer stark verminderten IFN α -Sekretion in PDCs [215]. Diese ergänzende Anforderung an die palindromische Teilsequenz ist auf den Prototyp M362 anwendbar, kann allerdings nicht einheitlich bestätigt werden. Das Kontrolloligonukleotid M385, welches keine CG-Dinukleotide nach Inversion mehr in seiner palindromischen Sequenz aufweist, zeigt lediglich eine minimal veränderte Immunstimulation. Ebenso entspricht die Sequenz 2395 dieser Voraussetzung nicht.

In Zellkulturversuchen wurde das immunstimulatorische Potential, IFN α zu induzieren, von den Prototypen der neu etablierten CpG-Oligonukleotidklasse C unter identischen Bedingungen untersucht. Wie erwartet, induzieren die Oligonukleotide C274 (2184 pg/ml), 2395 (2863 pg/ml) und M362 (2364 pg/ml) vergleichbar große Mengen an IFN α in PBMCs (n=14; Daten wurden nicht gezeigt). Die drei ausgewählten CpG-Oligonukleotide, die die drei charakteristischen Komponenten für CpG-C, allerdings mit unterschiedlichen flankierenden Nukleotiden, in ihrer Sequenz aufweisen, besitzen folglich nur ein gering abweichendes biologisches Muster.

IV.1.4. Ableitung einer Struktur-Wirkungsbeziehung

Die für das ODN 2216 aufgestellte Hypothese einer Struktur-Wirkungsbeziehung bezüglich dem immunstimulatorischen Parameter, der Induktion von IFN α in PDCs, konnte anhand der in der hier vorliegenden Arbeit generierten Daten auf die CpG-ODN, die der Klasse C angehören, ausgedehnt werden. Wie in Abb. 23 demonstriert, ergibt der Prototyp der CpG-C-ODN M362 zwei definierte Banden, die wahrscheinlich einer monomeren (M) und dimeren Form (D) entsprechen. Die zentrale palindromische Region der Sequenz ODN M362 kann für die Ausbildung eines Doppelstranges verantwortlich gemacht werden, was durch das Laufverhalten des Kontrolloligonukleotids M386, dem ein selbstkomplementärer Bereich in der Sequenz fehlt, bestätigt wird. ODN M386 zeigt eine klar abgrenzbare Bande, die in Anbetracht der Laufhöhe einer monomeren Struktur zugeordnet werden kann (Abb. 23, rechtes Gel).

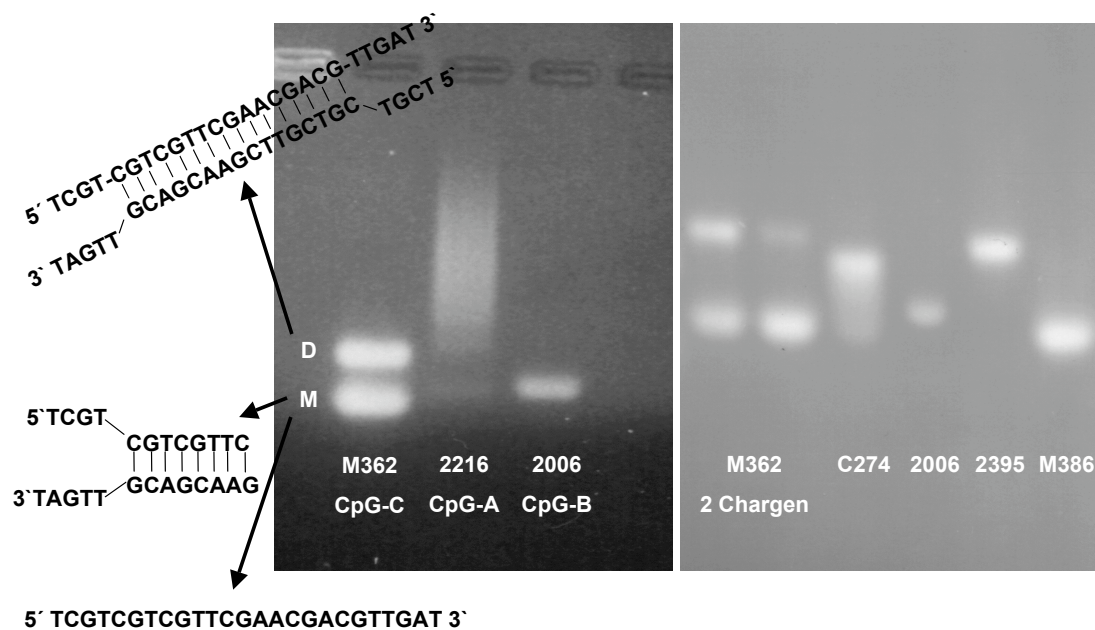


Abbildung 23 Strukturanalyse von ausgewählten CpG-Oligonukleotiden: Strukturanalyse der Prototypen der drei CpG-ODN-Hauptklassen, M362, 2216 und 2006 auf einem 3,5% Agarosegel (**linkes Gel**). Detektion erfolgte mit Ethidiumbromid. Unter gleichen Gelbedingungen wurden des Weiteren die drei Hauptvertreter von der CpG-C-Klasse (M362, C274 und 2395) und das Kontrolloligonukleotide (M386) untersucht (**rechtes Gel**). Abweichende Laufhöhen und Abstände zwischen den einzelnen Banden eines Oligonukleotids in den beiden gezeigten Gelen ergaben sich aufgrund unterschiedlicher Laufzeiten.

Anhand der Gelauswertung und den beschriebenen immunstimulatorischen Aktivitäten kann die bereits erhobene Struktur-Wirkungs-Hypothese erweitert werden. Die Hypothese wird zusätzlich

von der Tatsache unterstützt, dass das angeborene Immunsystem des Vertebraten eine Strategie entwickeln musste, bakterielle DNA, die während des Replikationvorganges neben der einzelsträngigen Form auch doppelsträngig vorliegt, zu detektieren. Zur Induktion von IFN α in PDCs ist von der primären Sequenz abgesehen die Bildung einer sekundären und/oder tertiären Struktur Voraussetzung. ODN 2216 stellt, neben einer viralen Infektion, den potentesten, synthetischen Stimulus für die Induktion von IFN α dar und bildet aufgrund seiner Sequenzelemente spontan und unter physiologischen Bedingungen stabile „Nukleinsäure-Nanopartikel“ aus [206]. ODN M362 induziert ebenfalls eine beträchtliche Menge an IFN α und bildet Duplexstrukturen aus, die unserer Hypothese entsprechend für die biologische Aktivität einen entscheidenden Beitrag leisten. CpG-B hingegen, bekannt als sehr schwacher IFN α -Induktor, liegt nur als einzelsträngiges, lineares Molekül vor. Aufgrund der hier beschriebenen Datenlage dient die Ausbildung sekundärer Strukturen sicherlich nicht nur der Stabilisierung des ODN gegenüber einer Degradierung durch 3'-Nukleasen [206, 218]. Zur Bestätigung der aufgestellten Struktur-Wirkungs-Beziehung müssten die einzelnen Gelbanden ausgeschnitten, die in dieser Bande vorliegende Oligonukleotid-Form aus dem Gel isoliert, aufgereinigt und die immunstimulatorische Aktivität in einem Zellkulturversuch überprüft werden. Allerdings muss bei dieser Untersuchung die schnelle Konformationsänderung der Oligonukleotidfraktionen beachtet werden.

Um die gerade erhobene Struktur-Wirkungs-Beziehung auf die beiden anderen Prototypen der neuen Klasse CpG-C, die unter **IV.1.3** vorgestellt wurden, zu übertragen, wurde eine weitere Gelanalyse (Abb. 23, rechtes Gel) durchgeführt. ODN M362 zeigt das oben erläuterte, bekannte Muster von zwei Banden. ODN 2395 lediglich eine scharf abgegrenzte Bande, die aufgrund der Laufhöhe zweifellos der dimeren Form zugewiesen werden kann. Bei ODN C274 gestaltet sich die Interpretation schwieriger: hier liegt wahrscheinlich eine Mischung von einzel- und doppelsträngigen Strukturen vor, die keine definierte Bande ergeben [215].

Der Unterschied im Verhältnis Monomer zu Dimer lässt sich teilweise über die Länge sowie der Nukleotidzusammensetzung der selbstkomplementären Region erklären. ODN 2395 enthält in seiner Palindromsequenz nur Cytosine und Guanine und bildet die doppelsträngige Struktur über die Basenpaarung Cytosin/Guanin aus; diese Watson-Crick-Bindung beruht auf drei linearen Wasserstoffbrückenbindungen. Hingegen werden bei der Paarung von Adenin und Thymin lediglich zwei Wasserstoffbindungen ausgebildet. Folglich wird bei einer G/C-Hybridisierung eine stabilere Bindung eingegangen. Bei ODN C274 und M362 sind alle vier Nukleotide in der Palindromsequenz vertreten; somit bilden sich Bindungen unterschiedlicher Energie aus. Die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung eines Doppelstrangs sowie die Stabilität des dabei entstandenen, partiellen

Doppelstranges ist demzufolge geringer. Auch die Länge der palindromischen Sequenz spielt eine nicht zu unterschätzende Rolle. Die genannten Gründe sind ein Erklärungsansatz für die bei M362 und C274 vorliegende Mischung unterschiedlicher struktureller Konformationen.

IV.1.5. CpG-C – möglicher therapeutischer Einsatz

Die Identifizierung der zwei wesentlichen CpG-sensitiven Immunzellen im Menschen, die B-Zelle sowie die PDC, ermöglicht eine rationale Basis für die Entwicklung von neuen, funktionell unterschiedlichen CpG-ODN. Unsere Studie spiegelt einen ersten Versuch wieder, sich dieser Information für die Identifizierung von CpG-ODN mit abweichenden, funktionellen Eigenschaften zu Nutzen zu machen. Innerhalb des Spektrums von Aktivitäten, die CpG-vermittelt sind, stellen die Vertreter der CpG-A-Klasse immunstimulatorische ODN bereit, die selektiv die PDC stimulieren. CpG-B-ODN repräsentieren eine Stimulationsform, die beide TLR9-tragenden Zellpopulationen aktivieren kann. Die Stimulation der PDC durch CpG-B-ODN unterscheidet sich jedoch qualitativ von der Aktivierung durch die Vertreter der CpG-A-Klasse: CpG-B-ODN begünstigen die Reifung der PDC, besitzen jedoch ein geringes Vermögen, IFN α in PDCs zu induzieren. Mit diesem Aktivierungspotential bietet der Einsatz von CpG-B-ODN den Vorteil, die unerwünschten Wirkungen von IFN α , die während einer Therapie mit rekombinantem IFN α beobachtet wurden [219], zu umgehen. Das CpG-C-ODN M362, das in unserer Studie erstmals identifiziert wurde, aktiviert die B-Zelle und induziert gleichzeitig in der PDC beträchtliche Mengen an IFN α und vereinigt somit die immunstimulatorischen Eigenschaften der etablierten CpG-ODN-Klassen A und B, die in der klinischen Erprobung im Zusammenhang mit einer Immuntherapie bei unterschiedlichen Tumoren bereits gute Resultate hervorbrachten. Die Kombination der Immuneffekte beider CpG-ODN-Klassen bei Einsatz eines Vertreters der CpG-C-Klasse hat möglicherweise einen zusätzlichen, noch nicht bekannten Nutzen [220].

Die drei Klassen von CpG-Oligonukleotiden repräsentieren einen kleinen Teil von möglichen Sequenzen eines Spektrums von CpG-ODN mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften. Es existieren mit Sicherheit andere Sequenzen, die ausschließlich B-Zellen aktivieren können oder die qualitativ unterschiedliche Kapazitäten besitzen, die B-Zelldifferenzierung zu modifizieren. Die Entwicklung einer Terminologie für CpG-Oligonukleotide sollte ein gemeinsames Anliegen sein, dass dazu beitragen würde, die Vielzahl von unterschiedlichen Ausdrücken, die in der Literatur benützt werden, zu vereinheitlichen.

Neben einer direkten Aktivierung der TLR9-tragenden Zellpopulationen durch CpG-C konnten noch indirekte Effekte nachgewiesen werden, die hauptsächlich über Zytokine, die durch CpG-C-ODN induziert werden, vermittelt werden [216]: Die beträchtlichen Mengen an $\text{IFN}\alpha$, die beim Einsatz von CpG-C oder CpG-A in Zellkultur von PDCs sezerniert werden, vermitteln eine starke lytische Aktivität von NK-Zellen. CpG-B-ODN zeigen diesen Effekt in viel geringerer Ausprägung. Dieses Ergebnis unterstützt die therapeutische Verabreichung von CpG-C-Oligonukleotiden zur Behandlung von Krankheiten, bei denen eine starke Aktivierung von NK-Zellen zur Bekämpfung des Krankheitserregers erforderlich ist.

Des Weiteren wurde der Einfluss von CpG-C-ODN auf Monozyten untersucht: CpG-C-ODN lösen innerhalb einer PBMC-Population bei Monozyten ein verändertes Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen aus, das für den Übergang vom Monozyten zur myeloiden dendritischen Zelle charakteristisch ist; CpG-C fördert folglich indirekt über die Induktion von $\text{IFN}\alpha$ den Reifungsprozess zur funktionellen dendritischen Zelle [216]. Angesichts dieses Befundes kann eine Stimulierung mit CpG-C-ODN eine antigenspezifische, zelluläre Antwort, die im Rahmen eines Vakzinierungsmodells gewünscht wird, begünstigen.

Den hier erörterten, immunstimulatorischen Aktivitäten zu Folge repräsentieren die neuen CpG-Oligonukleotide vielversprechende Kandidaten zum Einsatz als Th1-förderndes Vakzineadjuvans. Es existiert bereits eine Vielzahl von Studien, die den Gebrauch von CpG-B-ODN als Adjuvans beschreiben. Eine beträchtliche Steigerung der Immunantwort gegen das spezifische Antigen ist diesen Studien gemeinsam [94, 118]. Die adjuvante Aktivität von CpG-C-ODN wurde bereits im Mausmodell untersucht. Die Ergebnisse der Maus-Studie brachten hervor, dass bei gleichzeitiger Verabreichung von CpG-C-Oligonukleotiden, im Gegensatz zu CpG-A-ODN [116], in Kombination mit einem rekombinanten HBsAg eine vielfach höhere Antikörper-Antwort als bei alleiniger Gabe des Antigens ausgelöst wird. Hauptsächlich konnte unter den Antikörpern der Isotyp IgG2a nachgewiesen werden, der bei einer Th1-gerichteten Immunantwort vorzugsweise sezerniert wird [216]. Die zusätzliche Verabreichung von CpG-C-ODN erzielte auch im Primatensystem positive Resultate [217].

Des Weiteren hat die Firma Coley Pharmaceuticals bei *in vitro*-Studien mit humanen PBMCs, die von Hepatitis-C-Patienten gewonnen wurden, mit dem Stimulus CpG-C eine starke Immunantwort stimulieren können. Mit CpG-C-Oligonukleotiden scheint ein "neues Medikament" entdeckt, das nicht nur kurzfristig die Effekte des angeborenen Immunsystems, die vorübergehend die Viruslast kontrollieren können, aktiviert, sondern zusätzlich eine adaptive Immunreaktion, einschließlich

einer starken T-Zell-Antwort, induziert, die eine langanhaltende, antivirale Reaktion ermöglicht. Die vielversprechenden *in vitro*-Ergebnisse gaben Anlass zur vorklinischen Testung. Die bereits abgeschlossenen klinischen Studien der Phase Ia und Ib, die an chronischen Hepatitis-C-Patienten mit dem CpG-ODN 10101 (Actilon™), einem CpG-C-Vertreter, durchgeführt wurden, brachten positive Ergebnisse hervor: bei zweimaliger subkutanen Verabreichung von 20 mg Actilon™ pro Woche konnte die Viruslast nach vierwöchiger Therapie um mehr als 90% bei guter Verträglichkeit, auch der hohen Dosen, gesenkt werden (news & events, Homepage der Coley Pharmaceutical Group, 17. Mai 2005; Actilon™). Basierend auf den erfreulichen Resultaten der vorklinischen und klinischen Untersuchungen ist vorstellbar, dass Actilon™ breiten Einsatz in der Behandlung und der Prävention einiger Infektionserkrankungen finden kann. Aufgrund des Potentials sowohl die kurzfristige, angeborene als auch die langanhaltende, adaptive Immunantwort zu aktivieren, wären als weitere Einsatzgebiete, neben der Therapie einer chronischer Hepatitis C, HIV, Hepatitis B- oder Herpes-Infektionen zu nennen.

Neben den vorläufigen beeindruckenden Studienergebnissen bieten CpG-C-ODN einen weiteren Vorteil für die klinische Entwicklung im Vergleich zu den Vertretern der CpG-A-Klasse. Die Präsenz von PolyG-Motiven innerhalb der Sequenzen von CpG-A-ODN stellt eine große Herausforderung an die Entwicklungsabteilung des jeweiligen Herstellers. Die Synthese, die Aufreinigung sowie die Charakterisierung von PolyG-enthaltenden Oligonukleotiden stellt aufgrund der Tendenz zur Bildung von Aggregaten eine schwierige Aufgabe dar. Es konnte von unserer Arbeitsgruppe beobachtet werden, dass signifikante Unterschiede in der immunstimulatorischen Aktivität zwischen den einzelnen Chargen von ODN 2216 bestehen (nicht gezeigte Daten). Des Weiteren ist nicht aufgeklärt, welche strukturelle Form von ODN 2216 für die Induktion von IFN α in PDCs verantwortlich gemacht werden kann. Im Gegensatz dazu bedürfen die Vertreter der CpG-C-Klasse nicht der Ausbildung höhermolekulare Strukturen für ihr immunstimulatorisches Potential. Aus diesem Grund werden an die Herstellung und Charakterisierung von CpG-C-ODN geringere Anforderungen gestellt.

IV.2. B-Zell-PDC-Interaktion

IV.2.1. Erhöhte Mengen an IL-6 und IL-10 als Wegweiser für eine verstärkte

B-Zelldifferenzierung

IL-6 und IL-10 zählen zu einem Netzwerk von löslichen immunmodulatorischen Proteinen, die zusammen mit unterschiedlichen, membrangebundenen Rezeptoren und Gegenrezeptoren einen wesentlichen Beitrag zum Differenzierungsprozess einer B-Zelle leisten. Es ist in der Literatur fest etabliert, dass auf T-Zellhilfe, die auch durch CD40L-transfizierte Fibroblasten (CD40L) ersetzt werden kann, für die endogene Produktion dieser beiden Zytokine nicht verzichtet werden kann [221]. Das Zytokin IL-6, früher BSF-2 (*B cell-stimulatory-factor 2*) genannt, spielt hauptsächlich in der späten Phase einer B-Zellantwort, der terminalen Differenzierung vom nicht-Ig-sezernierenden Plasmablasten zur antikörperproduzierenden Plasmazelle, eine Rolle. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass der IL-6-Rezeptor nur auf aktivierten B-Zellen exprimiert wird [222]. Zusätzlich wird IL-6 auch die Funktion eines autokrinen Wachstumsfaktors nachgesagt [221].

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass B-Zellen, die über ihren B-Zell-Rezeptor mit dem polyklonalen Stimulus anti-Ig und dem mikrobiellen Molekül ODN M362 (CpG-C) in Kokultur mit PDCs stimuliert wurden, in etwa die doppelte Menge an IL-6 und IL-10 im Vergleich zu den Versuchsbedingungen ohne PDC sezernieren. Die synergistische Verstärkung der Zytokinsynthese durch die Anwesenheit der PDC konnte sowohl bei naiven B-Zellen als auch bei B-Gedächtniszellen nachgewiesen werden. Auffallend war das abweichende Zytokinniveau in den Bedingungen mit naiven B-Zellen im Vergleich zu denen mit B-Gedächtniszellen, was zum Teil auf den Differenzierungsgrad der jeweiligen Subpopulation zurückgeführt werden kann.

In unserem Kokultursystem weisen die detektierten IL-6-Konzentrationen daraufhin, dass die Anwesenheit der PDC schon in frühen Stadien der B-Zellentwicklung über die Anregung zur vermehrten Zytokinsekretion den Differenzierungsprozess positiv beeinflusst. Es ist vorstellbar, dass nicht nur die B-Zelle einseitig durch die Anwesenheit der PDC zur vermehrten Zytokinsekretion motiviert wird, sondern die Stimulierungsaktivität auf Gegenseitigkeit beruht. Vergleichbar zur bereits aufgeklärten DC/B-Zelle-Interaktion könnte die PDC zusätzlich an der IL-6-abhängigen B-Zelldifferenzierung über die Sekretion der löslichen Form von sgp80-IL-6-Rezeptor, die die biolo-

gische und von B-Zellen autokrin produzierte Form von IL-6 über die Bildung eines IL-6/sgp80-Komplexes potenzieren, beteiligt sein [158]. Diese Annahme ist allerdings zu bestätigen.

Die spezifische Beteiligung des endogen produzierten IL-6 an dem über PDCs vermittelten Differenzierungs-*Pathway* ist mit dem Abfangen des löslichen IL-6 belegbar; B-Zellen, die zwar über einen abweichenden Stimulationsweg aktiviert wurden, zeigten eine stark verringerte Sekretion von Immunglobulinen [221]. Bis dato konnte, wie auch die gerade zitierte Studie beweist, für die endogene Produktion von IL-6 und IL-10 nicht auf die Hilfe von T-Zellen verzichtet werden [221]. In unserer Studie scheint die PDC sowie die kombinierte Stimulationsart mit ODN M362 und anti-Ig die Funktion der T-Zelle in Bezug auf eine verstärkte Zytokinsekretion zu ersetzen.

Das im Kokultursystem vermehrt sezernierte, antiinflammatorische Zytokin IL-10 wird als potenter Inhibitor vieler durch CpG-ODN-vermittelter Aktivitäten beschrieben, obgleich IL-10 selbst durch CpG-haltige immunstimulatorische Sequenzen induziert wird. In PDCs inhibieren bereits geringe Mengen von IL-10 die Aktivierung, induzieren den Tod *in vitro* und können die IFN α -Produktion innerhalb einer Virus-aktivierten PBMC-Population stark reduzieren [223]. Ein Gegenspieler zu IL-10 ist IFN α , welches ein starker autokriner Überlebensfaktor für die PDC darstellt [224]. Die Resistenz der PDC gegenüber dem IL-10-vermitteltem Zelltod ist streng mit der Menge an IFN α korrelierbar [225]. Dieser jüngst beschriebene Effekt dürfte trotz der hohen IL-10-Konzentrationen in unserem Kokultursystem nicht relevant sein, da durch den Stimulus ODN M362 so große Mengen an IFN α induziert werden, die einem zytotoxischen Effekt von IL-10 entgegenwirken können.

IL-10 spielt eine bedeutende Rolle in der Amplifizierung einer humoralen Immunantwort. Wiederum konnte anhand von CD40-aktivierten B-Zellen demonstriert werden, dass die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen durch die exogene Zugabe von IL-10 positiv beeinflusst wird [226]. IL-10 wurde in einer weiteren Studie als ein Schlüsselmolekül der Keimzentrumreaktion bezeichnet, da es die Expansion von B-Gedächtniszellen beendet und sogleich die Entwicklung zu Plasmazellen induziert [227]. Mit diesen Daten korreliert die Tatsache, dass IL-10 die Expression von IL-6, dem potenten Wachstumsfaktor, stark verringert, sobald der Differenzierungsprozess durch IL-10 eingeleitet wird [221]. Des Weiteren wurde endogen produziertes IL-10 erst kürzlich als ein Regulator der CpG-ODN-induzierten IgG und IgM-Produktion identifiziert [228]. Zusammengefasst sind die durch die Anwesenheit der PDC gesteigerten Zytokinmengen von IL-10 und IL-6 als Vorboten für eine verstärkte B-Zelldifferenzierung zu deuten.

IV.2.2. Neuer, T-Lymphozyt-unabhängiger Pathway der Plasmazelldifferenzierung

Eine große Besonderheit in der hier gezeigten Studie ist die Generierung einer Plasmazelle *in vitro*, die sich von einer naiven B-Zelle ableitet und dies in der Abwesenheit einer T-Zell-vermittelten Kostimulation. Die zwei Zellpopulationen, B-Zelle und PDC, und eine angemessene mikrobielle Stimulation (CpG-C) verknüpft mit einem Modellstimulus für das B-Zellantigen (anti-Ig) war für die Differenzierung von naiven B-Zellen sowie B-Gedächtniszellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen vollkommen ausreichend.

Einige Studien sind über die Aktivierung von B-Zellen, die teilweise auch eine Auftrennung in die beiden B-Zellsubpopulationen vorgenommen hatten, mit CpG-ODN mit und ohne einem B-Zell-Rezeptorantigen verfügbar: 1. CpG-ODN können die Plasmazelldifferenzierung sowohl von naiven B-Zellen als auch von B-Gedächtniszellen fördern, die über ihren B-Zellrezeptor und ihr CD40-Antigen sowie mit den exogenen Zytokinen IL-2 und IL-10 stimuliert wurden [229]. 2. Die Arbeitsgruppe um A. Lanzavecchia berichtete von der Beobachtung, dass B-Gedächtniszellen bei Aktivierung mit dem CpG-B-ODN 2006 sogar in der Abwesenheit eines B-Zellrezeptor-Antigenes zu einer antikörperproduzierenden Plasmazelle differenzieren, naive B-Zellen jedoch eines größeren Aktivierungscocktail bedürfen [230]. Den beiden aufgezählten Studien ist gemeinsam, dass naive B-Zellen neben den Stimulantien, die eine B-Gedächtniszelle zur Plasmazellentwicklung benötigt, ein B-Zellantigen und ein entsprechendes CpG-ODN, eine zusätzliche T-Zellhilfe in Form von CD40L und/oder T-Zell-abgeleiteter Zytokine nicht entbehren können.

Das seltene Ereignis einer Plasmazelldifferenzierung in Abwesenheit einer T-Zelle existiert jedoch: In der frühen Ontogenese wird die B-Zellpopulation von einer kleinen Subpopulation dominiert, die B1-Zellen genannt und über den spezifischen Oberflächenmarker CD5 charakterisiert werden. Später beschränkt sich die B1-Zellpopulation auf die Pleura und auf das Peritoneum des Menschen, wo sie an lokalen Darm- und Lungen-assoziierten Immunantworten beteiligt ist [231]. Neuere Entwicklungen der B-Zell-Biologie weisen daraufhin, dass die Aktivität von B1-Zellen von T-Zellunabhängigen Antigenen (*thymus-independent antigen*; TI-Antigen) reguliert wird. TI-Antigene werden in TI-Typ-I-Antigenen, die B-Zellen polyklonal aktivieren, wie CpG-DNA, und in TI-Typ-II-Antigenen, die B-Zellen direkt aktivieren können, wie bakterielle Zellwandpolysaccharide, unterteilt. Den Typ-II-Antigenen ist gemeinsam, dass sie hochrepetitive Strukturen aufweisen, die B-Zell-Rezeptoren intensiv miteinander vernetzen [232]. Auch die sog. konventionellen B-Zellen (B2-Zellen) können an einer T-Lymphozyten-unabhängige Immunantwort, die hauptsächlich in der Sekretion von IgM und IgG3 münden, beteiligt sein. Die Plasmazelldifferenzierung aus

dieser B-Zellpopulation ist allerdings auf eine spezielle Untergruppe von TI-Antigenen [233] und auf einige virale Infektionen *in vivo* beschränkt [234].

Weiterhin ist beschrieben, dass dendritische Zellen (DC) in einem ausgewählten Zytokinmilieu T-Zell-unabhängig in der naiven B-Zelle den Differenzierungsprozess zur Plasmazelle und einen Ig-Klassenwechsel zu IgG und IgA induzieren können [197]. Dieser Prozess wird über die zwei Moleküle BLYS (*B lymphocyte stimulator protein*) und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*) vermittelt, die als Antwort auf Typ-I- und Typ-II-Interferon von der DC ausgeschüttet werden, von B-Zellen über TACI (*transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor*), BCMA (*B cell maturation antigen*) und BAFF-Rezeptoren erkannt werden und bei erfolgreicher Rezeptor-Ligand-Interaktion zur beschriebenen B-Zellaktivierung führen.

Die Ergebnisse, die in der zweiten Studie publiziert wurden, können aufgrund ihrer postulierten CD40L-Unabhängigkeit angezweifelt werden. Dieser Kritikpunkt ist ebenfalls auf das hier beschriebene Zellkultursystem übertragbar. CD40L wird nicht ausnahmslos von aktivierten T-Zellen exprimiert. Auch andere Zellpopulationen können unter bestimmten Voraussetzungen CD40L auf ihrer Oberfläche tragen. Hierzu zählen aktivierte Endothelzellen [235], Mastzellen [236], Blutplättchen [237], dendritische Zellen [238] sowie aktivierte B-Zellen selbst [239]. Aufgrund dieser Tatsache könnte eine T-Lymphozyten-unabhängige Plasmazelldifferenzierung, die durch PDCs ausgelöst wird, ermöglicht werden. Aufgrund der Aufreinigungsschritte zur Isolation der in unserem Kultursystem eingesetzten Zellpopulationen kann eine Verunreinigung mit Blutplättchen, Mastzellen oder Endothelzellen nahezu ausgeschlossen werden. Allerdings wäre es vorstellbar, dass B-Zellen unter der beschriebenen Stimulation CD40-Ligand, der mit der Sequenz des CD40L von T-Zellen identisch ist [239], exprimieren und die im System vorliegenden B-Zellen einer gegenseitigen Aktivierung unterliegen. Überraschend war der Literaturbefund, dass humane DCs des peripheren Blutes ebenfalls CD40L exprimieren können. Das Expressionsniveau von CD40L liegt niedriger als das aktivierter T-Zellen, kann jedoch über die Ligation eines CD40-Antigens einer weiteren DC sowohl nachweisbar auf mRNA als auch Proteinebene erhöht werden. Es besteht folglich die Möglichkeit, dass der auf DCs exprimierte CD40L an der B-Zellaktivierung beteiligt ist [238]. Da zum Zeitpunkt dieser Veröffentlichung der gerade zitierten Daten die Population der PDC noch nicht entdeckt war, müsste unter den in unserem Kultursystem vorliegenden Bedingungen das CD40L-Expressionsmuster der PDC untersucht werden. Erst dann kann die Möglichkeit einer CD40L-Beteiligung vollends ausgeschlossen werden.

IV.2.3. *IFN α als ein Schlüsselmolekül der B-Zell-PDC-Interaktion*

Der molekulare Mechanismus der DC-abhängigen Regulation einer B-Zellantwort wurde bereits entschlüsselt. Hierfür wurden drei löslichen Faktoren verantwortlich gemacht, die von der CD40-aktivierten MDC freigesetzt werden: IL-12, IL-6 und sgp80, eine Komponente des IL-6-Rezeptors [158]. Dies veranlasste uns, die Faktoren zu identifizieren, die in die PDC-vermittelte B-Zellaktivierung involviert sind. PDCs sezernieren nur eine begrenzte Anzahl von Zytokinen, von denen bekannt ist, dass sie B-Zellen Signale geben können; hierzu zählt IFN $\alpha\beta$ [240] sowie IL-6 [241]. Wir konzentrierten uns auf den Einflussfaktor Typ-I-IFN. Bezeichnend war der starke prozentuale Rückgang der Plasmazellfrequenz durch das Abfangen des löslichen IFN α/β und der gleichzeitigen Blockade des IFN α/β -Rezeptors. Anhand dieses Ergebnisses wurde deutlich, dass die hier untersuchte B-Zell/PDC-Interaktion zu einem großen Teil über den löslichen Faktor IFN α vermittelt wird. Die zweite Möglichkeit der Einflussnahme auf eine interagierende Zellpopulation ist neben löslichen Faktoren ein Zell-zu-Zell-Kontakt. Dieser Effekt kann nahezu ausgeschlossen werden, da Überstände, die von PDC-Kulturen nach Stimulation mit CpG-C-ODN M362 gewonnen wurden, aktivierte B-Zellen immer noch zur Differenzierung von Plasmazellen verhelfen (nicht gezeigte Daten).

Die IFN α/β -Blockade ging mit einer deutlichen Reduktion der Plasmazellfrequenz einher, konnte den Differenzierungsprozess jedoch nicht vollständig unterbinden. Auch die exogene Zugabe von IFN α kann die Effekte der PDC auf den Ausdifferenzierungsprozess der B-Zelle nicht ersetzen (nicht gezeigte Daten). Es werden folglich noch weitere von der PDC sezernierte Faktoren beteiligt sein. In Anlehnung an die MDC/B-Zell-Interaktion [197, 242] wäre vorstellbar, dass die beiden Moleküle BLYS und APRIL, die durch die Anwesenheit von IFN α in der MDC induziert werden, in den hier erläuterten Prozess involviert sind. Dies ist gerade Gegenstand der Forschung einer anderen Forschungsgruppe. Erste genomische Analysen von ruhenden und Virus-aktivierten PDCs verneinen die aufgestellte Hypothese einer verstärkten Transkription von BLYS und APRIL (Piqueras B, Palucka AK, nicht publizierte Daten, [243]). Folglich kontrollieren die beiden DC-Subpopulationen die B-Zellentwicklung nicht über die gleichen molekularen *Pathways*.

Weiterhin präsentieren unsere Daten, dass die Anwesenheit der PDC nicht nur den Differenzierungsprozess zur Plasmazelle fördert, sondern auch die nachfolgende Sekretion von Immunglobulinen steigert. In den Kokulturbedingungen mit naiven B-Zellen konnte lediglich das primär von einer B-Zelle sezernierte IgM nachgewiesen werden, was den Prozess eines *Isotype-Switches* in der naiven B-Zelle ausschließt.

Ob das von der PDC sezernierte IFN α/β für die vermehrte Produktion von Immunglobuline gleichfalls wie für die Plasmazelldifferenzierung verantwortlich gemacht werden kann, ist nicht klar zu beantworten. Aus den Ergebnissen des IFN α/β -Blockade-Versuch kann kein eindeutiger Schluss gezogen werden, ob IFN α/β auf die Antikörperproduktion Einfluss nimmt (nicht gezeigte Daten). Auch der Beitrag von IL-6 zur Immunglobulinsekretion ist nicht zu unterschätzen. Die kürzlichst veröffentlichte Studie, in der ebenfalls die Beteiligung der PDC an der humoralen Immunantwort untersucht wurde, hat detailliert beschreiben können, dass IFN α für den ersten Schritt im Differenzierungsprozess einer B-Zelle zum Plasmablasten verantwortlich gemacht werden kann, das von der PDC sezernierte IL-6 die terminale Differenzierung vom Plasmablasten zur Plasmazelle bestimmt [243]. Auf einem vergleichbaren 2-Stufen-Prozess beruht der Beitrag der DC zur Differenzierung einer naiven B-Zelle: hier kooperieren aufeinanderfolgend die beiden Zytokine IL-12 und IL-6 [158, 244]. Diese Befunde stimmen mit der Kinetik der Expression des IL-6-Rezeptors überein, die für die Plasmazelldifferenzierung *in vitro* und *in vivo* beschrieben wurde. Diese Datenlage bietet unter anderem eine Erklärung, dass die IFN α/β -Blockade in unserem Kultursystem einen unerwartet schwach ausgeprägten Einfluss auf die Immunglobulinsekretion gezeigt hat.

Die Beteiligung von IFN α an der Immunglobulinproduktion wurde bereits in den 70iger Jahren von einigen wissenschaftlichen Gruppen *in vivo* an Mäusen untersucht. Diese Studien brachten kontroverse Ergebnisse hervor [244-248]. Während einige Autoren über einen inhibitorischen Effekt berichteten, konnten andere diesen negativen Einfluss von IFN α nicht bestätigen und/oder sahen einen mäßigen stimulatorischen Effekt. Die variablen Ergebnisse stehen eng mit den verschiedenen Zeitpunkten der IFN α -Injektion und mit der eingesetzten IFN α -Menge im Zusammenhang. Ein genereller Trend zeichnete sich dahingehend ab, dass eine Behandlung mit IFN α vor der Vakzinierung eine ausgeprägte humorale Immunantwort verhindert, während eine der eigentlichen Impfung anschließende IFN α -Injektion die Antikörperproduktion steigert. Nachdem die Expression von IFN α nach Antigenexposition sowieso den Abläufen, die sich während einer viralen Infektion ereignen, näher kommt, implizieren die Ergebnisse, dass IFN α/β in Abhängigkeit der vorliegenden Konzentration einen gewissen Beitrag zur Verstärkung einer humoralen Immunantwort leistet.

Die Beteiligung von IFN α an der terminalen B-Zelldifferenzierung liefert einen zellulären Mechanismus für frühere Studien, die eine gesteigerte Ig-Sekretion bei humanen B-Zellen, die mit IFN α vorbehandelt wurden, zeigten [249, 250]. Des Weiteren stellt es eine Erklärungsmöglichkeit für den vor kurzem veröffentlichten adjuvanten Effekt von Typ-I-IFN auf die humorale Immunantwort dar. Interessanterweise wurde in dieser Veröffentlichung beobachtet, dass IFN α/β eine antikörper-

produzierende Immunantwort verstärkt und einen Ig-Klassenwechsel *in vivo* auslösen kann, jedoch die einzige Zellpopulation, die auf IFN α/β reagieren kann, die dendritische Zelle ist [41]. In unserer Studie konnte, trotz der Produktion von großen Mengen an IFN α und der Anwesenheit einer DC-Subpopulation, nicht nachgewiesen werden, dass PDCs einen *Isotype-Switch* in einer Kokultur mit naiven B-Zellen auslösen kann. Deshalb scheint die PDC alleine nicht befähigt zu sein, die wichtigen Signale zwischen B-Zelle und T-Zelle, die einen *Isotype-Switch* herbeiführen, zu ersetzen.

IV.2.4. Neue Funktion der plasmazytoiden dendritischen Zelle in der adaptiven Immunantwort

Die entscheidende Funktion der dendritischen Zelle in der Auslösung einer humoralen Immunantwort wurde bereits in einigen, wenigen Studien beschrieben [251, 252]. In den genannten Untersuchungen wurde jedoch das Hauptaugenmerk auf die Population der myeloiden dendritischen Zellen (MDC) gelegt. Zusätzlich wurde in den meisten Fällen die Beteiligung der MDC aufgrund der direkten Effekte auf T-Zellen untersucht, die in der Folge B-Zellen kontrollieren. Es wurde meist nicht die Option berücksichtigt, dass DCs direkt mit B-Zellen interagieren und das von ihnen aufgenommene, unprozessierte Antigen an die B-Zelle weitergeben können [253]. Vor kurzem konnte die direkte B-Zell-DC-Interaktion nachgewiesen werden: myeloide DCs beeinflussen nicht nur die B-Zellproliferation, sondern lösen auch einen *isotype-switch* zu IgA aus und fördern die Plasmazelldifferenzierung [254]. Die beschriebenen Daten schließen immer eine T-Zell-abhängige Aktivierung nicht nur der B-Zelle, sondern auch der dendritischen Zelle ein. Im Unterschied zur PDC, die den beschriebenen Effekt auf die B-Zelldifferenzierung zum größten Teil über die Produktion von IFN α vermittelt, lässt sich der Einfluss der MDC auf die naive B-Zelle über IL-12 und IL-6 erklären [158].

Die von uns generierten Daten und eine vor kurzem erschienene Veröffentlichung beleuchteten erstmals die Beteiligung der PDC an der B-Zelldifferenzierung. Die Arbeitsgruppe um G. Jego arbeitete jedoch mit einem stark abweichenden Studiendesign [243]. Hier konnte für die Induktion der Plasmazelldifferenzierung nicht auf die Unterstützung einer T-Zelle verzichtet werden. B-Zellen wurden über ihr CD40-Antigen aktiviert, zur Induktion von IFN α in der PDC wurden Influenza-Viren eingesetzt. Im Vergleich dazu scheint in unserem System die PDC eine Alternative zur T-Zellhilfe zu sein und das neue CpG-C-ODN M362 gleich zwei Funktionen zu übernehmen: einerseits imitiert es die virale Stimulation der PDC, andererseits die CD40L-vermittelte Stimulation der B-Zelle.

An unseren Daten kann eindeutig festgemacht werden, dass die PDC weder die naive B-Zelle noch die B-Gedächtniszelle in ihrer Aktivierung bevorzugt. Zur Induktion eines *Isotyp-Switches* in der naiven B-Zelle fehlen allerdings noch Signale, die die PDC unter den gegebenen Umständen nicht zu senden vermag. Mit diesen Erkenntnissen kann ein in MHC-II-*knock-out*-Mäusen gesehener, verwandter Effekt aufgeklärt werden. Mäuse, denen aufgrund eines MHC-II-Defizits jegliche CD4-T-Zellhilfe fehlt, können eine neutralisierende, humorale Immunantwort gegen das Glykoprotein des *Vesicular stomatitis virus* (VSV) hervorrufen. Es konnte neben IgM allerdings kein IgG detektiert werden. Die Induktion einer IgG-Sekretion schließt folglich die Anwesenheit einer CD4⁺-T-Zelle ein [234]. Übereinstimmend mit dieser Studie demonstrieren unsere Ergebnisse, dass eine Kokultur von PDCs und naiven B-Zellen, die mit einem mikrobiellen Stimulus, der eine virale Infektion imitieren kann, aktiviert wurden, zur Plasmazelldifferenzierung und zur IgM-Produktion ohne T-Zellhilfe führt. Vergleichbar zur Beschränkung auf die IgM-Produktion im Virusmodell in der Abwesenheit einer T-Zellhilfe, konnte in unserer Studie auch kein *Isotype-Switch* in der naiven B-Zelle bewirkt werden. Somit bietet die hier beschriebene Funktion der PDC in der terminalen Differenzierung zu einer IgM-produzierenden Plasmazelle eine Erklärung für die humorale CD4⁺-T-Zell-unabhängigen Immunantwort während einer viralen Infektion *in vivo*.

Es wurde folglich eine neue, entscheidende Funktion der PDC in der Einleitung einer humoralen Immunantwort entdeckt. Insbesondere ist hervorzuheben, dass hier erstmals ein B-Zelldifferenzierungs-*Pathway* beschrieben wird, der sowohl die Beteiligung der PDC einschließt als auch die Unabhängigkeit von der Anwesenheit einer T-Zelle betont. Infolgedessen kann die PDC als Alternative zur T-Zelle den B-Zelldifferenzierungsprozesses in einigen Bereichen ersetzen.

IV.2.5. Funktion von TLR9 in der B-Zell-PDC-Interaktion

In dieser Studie setzten wir die neu identifizierte und oben im Detail beschriebene CpG-ODN-Klasse CpG-C ein, die das erste definierte mikrobielle Molekül darstellt, dass beide TLR9-exprimierenden Zellpopulationen, sowohl B-Zellen als auch PDCs, gleichzeitig aktivieren kann [IV.1, 215]. Die Synergy, die unter der mikrobiellen Stimulation und einer simultanen BCR-Ligation beobachtet wurde, brachte die Idee auf, ob möglicherweise eine modulierte TLR9-Expression in B-Zellen für den gesehenen Effekt verantwortlich gemacht werden kann. Überraschenderweise war nur eine geringe Menge an TLR9mRNA bei einer kombinierten Stimulation mit B-Zell-Antigen und CpG-C-ODN nach 12 Stunden nachweisbar [255]. Dies bestätigt frühere Daten, die von unserer Arbeitsgruppe generiert wurden; sie zeigten, dass an zwei Zeitpunkten, nach 3

und 15 Stunden Inkubation von B-Zellen mit CpG-B-ODN 2006, die Anzahl der TLR9-Transkripte im Vergleich zur Kontrolle stark gemindert war [97]. Dementsprechend scheint die Regulation der TLR9-Expression nicht in den synergistischen Effekt von BCR-Ligation, CpG-C-ODN M362 und dem von der PDC produziertem IFN α während der achttägigen Plasmazellentwicklung involviert zu sein.

Die Arbeitsgruppe um A. Lanzavecchia berichtete nahezu zum gleichen Zeitpunkt von Beobachtungen, die im Widerspruch zu den gerade beschriebenen Ergebnissen stehen [256]. Sie untersuchten ebenfalls das TLR-Expressionsmuster von B-Zellen und präsentierten eine verstärkte Expression von TLR9 nach Stimulation mit anti-Ig und ODN 2006. Der Grund für die gegensätzlichen Aussagen kann vielschichtig sein. Eine Erklärungsmöglichkeit ist die unterschiedlich gewählte Inkubationszeit. Bei den oben erläuterten Daten kann ein vorübergehender Anstieg von TLR9-Transkripten innerhalb der ersten Stunden nach Stimulation nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Option zur Erklärung der aufgezeigten Resultate ist, dass eine Auftrennung in die zwei B-Zellsubpopulationen vorgenommen wurde und nicht die unaufgetrennte Population der Gesamt-B-Zellen untersucht wurde und eine abweichende Stimulation erfolgte.

Die gerade zitierte Publikation hat durch die Untersuchung der aufgetrennten B-Zellpopulation einen weiteren, interessanten Aspekt offen gelegt. Es bestehen große Unterschiede im TLR-Expressionsmuster zwischen naiven B-Zellen und B-Gedächtniszellen, von besonderer Bedeutung sind für uns die Unterschiede in der TLR7- und TLR9-Expression. Naive B-Zellen exprimieren die genannten TLRs auf sehr geringem bis nicht detektierbaren Level, steigern jedoch die Expression beträchtlich durch eine B-Zell-Rezeptor-Ligation. Hingegen zeigen B-Gedächtniszellen konstitutiv eine hohe Expression von TLR7 und TLR9. Konsequenterweise konnte auf dieser Basis nachgewiesen werden, dass B-Gedächtniszellen durch die alleinige Stimulation mit CpG-DNA proliferieren und sich zu Ig-sezernierenden Plasmazellen entwickeln, während naive B-Zellen die simultane Aktivierung des B-Zellrezeptors und des TLR9 für den Differenzierungsprozess benötigen. Diese Daten führten zu einem Modell, das auf der engen Verknüpfung von BCR und TLR beruht: Erst bindet das Antigen an den BCR und löst die Expression von TLR9 aus. In einem zweiten Schritt werden das Antigen und der assoziierte TLR9-Ligand in die Zelle internalisiert, wo sie im endosomalen Kompartiment mit dem neu synthetisierten TLR9 interagieren. Die direkte Kopplung von Antigen an CpG-ODN sei in der Folge ausreichend, um eine T-Zell-unabhängige Immunantwort auszulösen. Die hier gezeigten Daten sind grundsätzlich auf das dargestellte Modell zu übertragen. Auch wir konnten in den Kokulturen mit naiven B-Zellen mit dem Stimulierungscocktail anti-Ig und CpG-C eine Differenzierung zur antikörperproduzierenden Plasmazelle hervorrufen, die allei-

nige Stimulation mit CpG-C war, im Gegensatz zu den Kokulturen mit B-Gedächtniszellen, nicht ausreichend. Ferner war natürlich die Anwesenheit der PDC immer dringend erforderlich.

In humanen, naiven B-Zellen ist die Aktivierung des TLRs von einer vorangegangenen BCR-Ligation abhängig. Im Gegensatz zur Funktion von TLRs auf dendritischen Zellen, die über die Auslösung des Reifungsprozesses eine Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort schlagen, haben TLRs in der B-Zelle unterschiedliche Funktionen. Die BCR-induzierte Expression von TLRs in der naiven B-Zelle verhindert eine polyklonale Aktivierung in einer primären Immunantwort, da die Stimulation auf antigenspezifische B-Zellen beschränkt ist. Im Gegensatz dazu erlaubt die konstitutive TLR-Expression in B-Gedächtniszellen eine polyklonale Aktivierung des bestehenden Gedächtnis-*Pools*. Folglich sind TLRs in humanen B-Zellen dem BCR nachgeschaltet und spielen eine bedeutende Rolle sowohl in der primären Immunantwort als auch in der Aufrechterhaltung des serologischen Gedächtnisses.

IV.2.6. Auslösung eines CD40L-unabhängigen isotype-switch in naiven B-Zellen

Es wurde lange Zeit angenommen, dass für den DNA-Rekombinationsprozess, der einem *Ig-Isotype-Switch* vorgeschaltet ist, CD40L zwingend erforderlich ist, da die Produktion von IgG, IgA und IgE bei der Erkrankung des Hyper-IgM-Syndroms, die durch eine Mutation im CD40L-Gen verursacht wird, zweifelsohne stark eingeschränkt ist [257]. Jedoch können virale Glykoproteine und bakterielle Polysaccharide zur Produktion von IgG und IgA auch in der Abwesenheit von CD40L-exprimierenden CD4⁺-T-Zellen führen. T-Zellunabhängiger Ig-Klassenwechsel erfolgt in B1-Zellen, die sich in der Marginalzone der Milz oder in der intestinalen Lamina propria befinden, und führt zu einem sofortigen Schutz gegen eingedrungene Pathogene [233]. Die genauen Anforderungen an einen T-Zellunabhängigen *Isotype-Switch* sind bis dato jedoch nicht gänzlich geklärt. Da die Interaktion von MDCs und naiven B-Zellen zur Produktion von IgG und IgA führt, was einen erfolgreichen *Isotype-Switch* voraussetzt [254], erhoben wir die Annahme, ob nicht die MDC, neben der PDC, die Auslösung einer CD40L-unabhängigen Ig-Klassenwechsels bewirken könnte.

Zellen myeloider Herkunft, wie Monozyten und MDCs, exprimieren das Molekül BLyS nach Stimulation mit IFN α , IFN γ oder CD40L [258, 259]. Dieses Molekül gehört der TNF-Superfamilie an und bindet an drei Rezeptoren, die selektiv auf der Oberfläche von B-Zellen präsentiert werden: BCMA, TACI und BR3 [260]. Antigenpräsentierende Zellen exprimieren noch einen weiteren Ligand, APRIL, der mit hoher Affinität an BCMA bindet und dessen Funktion bis dato nicht voll-

ständig geklärt wurde [261]. Die Bindung von BLYS an einen der drei spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche einer B-Zelle aktiviert einen CD40-ähnlichen *Pathway*, der das B-Zellüberleben über die Expression der antiapoptotischen Moleküle NF- κ B und Bcl-2 fördert [262]. Ein BLYS-Defizit verhindert, im Vergleich zu einem CD40L-Mangel, die Immunglobulinantwort sowohl auf TD- als auch TI-Antigene [263].

Nach Inkubation mit IFN α sezernieren Monozyten und DCs BLYS und APRIL und ermöglichen in Gegenwart entsprechender Zytokine, wie IL-10, die Auslösung eines DNA-Rekombinationsprozesses in humanen naiven B-Zellen, der die Grundlage für einen Ig-Klassenwechsel bildet. Zusätzlich bedarf es einer B-Zell-Rezeptor-Ligation und der Anwesenheit von IL-15 für die nachgeschaltete Sekretion der „*class-switched*“ Antikörper IgA und IgG [197]. Interessanterweise erfolgt dieser Ig-Klassenwechsel ohne direkten Kontakt einer B-Zelle mit einer T-Zelle und scheint eine Erklärungsoption für die beschriebene IgG/IgA-Produktion zu bieten, die in der Abwesenheit von CD4⁺-T-Zellen und in CD40L-defizienten Mäusen beobachtet wurden [264-266].

Die *in vivo*-Induktion von Typ-I-IFN in naiven Mäusen durch die Injektion von poly(I:C) in Begleitung einer Antigenverabreichung löst die Produktion von spezifischen IgG-Antikörpern aller Subklassen aus [41]. Der beobachtete Effekt ist IFN α/β -abhängig, da die Ig-Sekretion in IFN $\alpha\beta$ R-defizienten Mäusen ausblieb. Weiterhin war interessant, dass IFN $\alpha\beta$ nur eine Antikörperproduktion in Mäusen auslösen konnte, deren DCs über einen Typ-I-IFN-Rezeptor verfügen. Dieses gerade erläuterte Modell ist auch mit der Veröffentlichung übereinstimmend, die zeigte, dass IFN α -aktivierte DCs die IgG- und IgA-Sekretion in Patienten mit SLE verstärken [267].

Diese Ergebnisse führten in Anlehnung an die zitierten Publikationen zu der Idee, dass bei Aufnahme einer dritten Zellpopulation, der MDC, in das hier vorgestellte Kokultursystem folglich alle Voraussetzungen für einen CD40L-unabhängigen *Isotype-Switch* gegeben sein müssten. Dies könnte als eine Art „*ménage à trois*“ zwischen B-Zelle, PDC und MDC unter Ausschluß einer T-Zellpopulation bezeichnet werden.

IFN α , das im vorliegenden System von der PDC auf Stimulation mit CpG-C in großen Mengen sezerniert wird, wird als Induktor für die gesteigerte Expression von BLYS und APRIL in der MDC beschrieben [197]. Die Bedeutung von BLYS in der humoralen Immunantwort konnte bereits in einigen Studien nachgewiesen werden: Die Applikation von BLYS im Mausmodell resultierte in

einem 5-fachen Anstieg der Serumspiegel für IgM und immerhin in einer Verdoppelung der IgA-Mengen [268]. Weiterhin entwickelten Mäuse, die für das Molekül BLyS transgen verändert wurden, Autoimmunerkrankungen, die sich in einer vermehrten Formation von Keimzentren, in der Produktion von Autoantikörpern und einer Ig-Akkumulation in der Niere äußerten [269]. Diese Daten heben nicht nur die bedeutende Funktion von BLyS hervor, sondern eröffnen auch die Möglichkeit, dass über die Regulation der BLyS-Expression folglich die B-Zellfunktion verändert werden kann. IL-10, welches in unserem System in beträchtlicher Menge von B-Zellen produziert wird, kann ebenso die Sekretion von BLyS und APRIL auslösen [270] und ist für den DNA-Rekombinationsprozess mitentscheidend [197].

Die Anwesenheit von löslichen Zytokinen ist neben anderen stimulatorischen Signalen wesentlich für die Induktion eines *Isotype-Switch* und auch für die nachfolgende Ig-Sekretion [271-273]. Von IL-15 als ein Kostimulator ist bekannt, dass es die Proliferation von aktivierten B-Zellen und die Sekretion von IgM, IgG und IgA induzieren kann [274]. DCs, eine Zellpopulation, die neben vielen weiteren IL-15 sezernieren kann, zeigen nicht nur eine gesteigerte Expression des Zytokins IL-15, sondern auch eine erhöhte Anzahl von IL-15-Rezeptor-Transkripten (IL-15R α), sobald sie Signale, die mit einer Infektion assoziierbar sind, empfangen: hierzu zählt IFN α/β , doppelsträngige RNA, wie poly(I:C), oder LPS [277]. Eine gesteigerte Expression von IL-15 nach Behandlung mit IFN α konnte sowohl in humanen als auch in murinen DCs nachgewiesen werden [275, 276].

Nachdem wir vor dem Problem standen, drei Zellpopulationen mit maximaler Reinheit, vor allen Dingen mit einer geringst möglichen Verunreinigung mit T-Zellen zu isolieren, sollten Vorversuche erstmals unter dem Einsatz von IL-15 gestartet werden. IL-15, wie oben erläutert, führt als Kostimulation zu CD40L zur Sekretion von IgM, IgG und IgA [274]. Da in der hier vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, dass PDCs die B-Zelldifferenzierung bis zum Stadium einer IgM-sezernierenden Plasmazelle stark fördern und diesbezüglich alternativ zur T-Zelle eingesetzt werden können, konnte man sich vorstellen, dass IL-15 als ein von der MDC produzierter Kostimulus die MDC in ihrer Funktion teilweise vertreten kann. Mit diesen Versuchen sollte nur eine Tendenz erarbeitet werden, ob die von uns aufgestellte Annahme einer „ménage à trois“ Recht behält (Abb. 24).

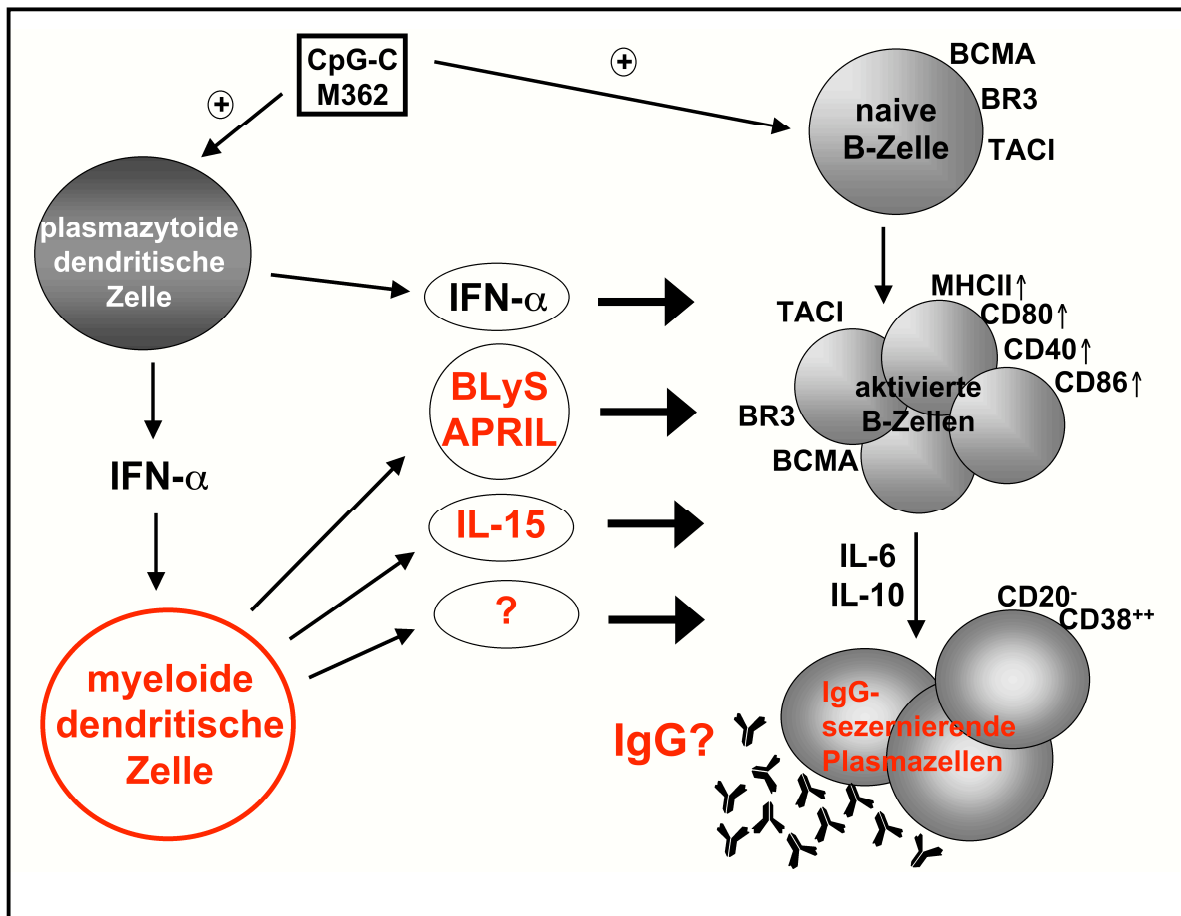


Abbildung 24 Idee einer „Dreiecksbeziehung“ zwischen naiver B-Zelle, PDC und MDC ohne T-Zellbeteiligung. Unter der Stimulation ODN M362 werden B-Zellen sowie PDCs direkt aktiviert. Das von der PDC unter den gegebenen Bedingungen sezernierte IFN- α soll in der myeloiden dendritischen Zelle die Ausschüttung der Moleküle BLYS/APRIL und des Zytokins IL-15 auslösen sowie den B-Zelldifferenzierungsprozess, wie unter III.2.2 beschreiben, fördern.

Die Ergebnisse waren auf dem ersten Blick positiv überraschend und mit unserer Annahme, unter den beschriebenen Gegebenheiten einen *isotype-switch* auslösen zu können, übereinstimmend. Eine genauere Betrachtung ließ Zweifel aufkommen. Naive B-Zellen reagierten in den hier gezeigten Daten bereits auf den mikrobiellen Stimulus CpG-ODN und bedurften keiner zusätzlichen BCR-Ligation. Es ist in der Literatur fest etabliert, dass naive B-Zellen zur Aktivierung von einem Signal über ihren B-Zell-Rezeptor abhängig sind, hingegen B-Gedächtniszellen mit CpG-ODN und einem entsprechenden Zytokin ohne vorherige B-Zellrezeptor-Ligation aktivierbar sind [230, 256]. Wie auch die vorangegangenen Daten bezeugen, wird die Immunantwort einer B-Gedächtniszelle nicht signifikant über die Zugabe von anti-Ig beeinflusst, was indiziert, dass die stimulatorischen Bedingungen, die durch polyklonale Aktivatoren hervorgerufen wurden, für B-Gedächtniszellen zur Stimulation vollkommen ausreichend sind. Dies hat zur Konsequenz, dass in Abwesenheit eines spezifischen Antigens nur B-Gedächtniszellen als Antwort auf einen polyklonalen Stimulus proliferieren und zu antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren. Unter den gegebenen Bedin-

gungen dürften sich naive B-Zellen, trotz der Anwesenheit von IL-15, nicht einmal teilen; es dürfte lediglich beobachtet werden, dass die Expression von CD69 und CD86 verstärkt ist und die Zellen an Größe zunehmen ([230], *unpublished data Bernasconi NL, Traggiai E*).

Aufgrund dieser „Sachlage“ wird wahrscheinlich die Verunreinigung der Population von naiven B-Zellen mit B-Gedächtniszellen, die im Durchschnitt bei 10% liegt, für den gesehenen Effekt verantwortlich gemacht werden können. Zusätzlich kann durch den Wachstumsfaktor IL-15 der ursprünglich kleine Anteil an B-Gedächtniszellen innerhalb der 13tägigen Inkubationszeit stark anwachsen [230] und der Produzent für die detektierten IgG-Mengen sein. Aber auch eine positive Bilanz kann aus den dargestellten Daten gezogen werden: eine von den normalen Kontrollen gelöste Aktivierung von naiven B-Zellen, die üblicherweise über das B-Zellantigen und über CD4⁺-T-Zellen bewerkstelligt werden, würde das Risiko für eine Autoimmunreaktion erhöhen.

Allerdings ist mit dieser Datenlage die Idee einer „Dreiecksbeziehung“ zwischen B-Zelle, PDC und MDC nicht zerschlagen. Weitere Untersuchungen müssten mit abweichendem Versuchsaufbau unternommen werden: Anstatt der Zugabe von IL-15 sollten MDCs oder Monozyten zur Kokultur gegeben werden, da neben den bereits identifizierten Molekülen BLYS und APRIL und dem von der MDC unter IFN α -Einfluss sezernierten IL-15 weitere, noch nicht entdeckte Moleküle beteiligt oder ein Zell-zu-Zell-Kontakt in den Prozess involviert sein könnten. Des Weiteren ist zu überprüfen, ob der von CpG-C-abgeleiteter Stimulus IFN α ausreichend ist, dass BLYS und APRIL exprimiert und IL-15 sezerniert wird. Als weiterer Punkt müsste an der Optimierung der Isolationsmethode von naiven B-Zellen gearbeitet werden, um den „verunreinigten“ Anteil mit B-Gedächtniszellen möglichst zu minimieren. Zum Nachweis eines *isotype-switch* sollten nicht nur die detektierbaren IgG-Konzentrationen herangezogen werden, sondern die molekulare Grundlage, der DNA-Rekombinationsprozess, mittels *western-blotting* nachgewiesen werden. Versuche, die sich mit dieser Thematik befassen, werden zurzeit von Hendrik Poeck durchgeführt.

Zu unserer Überraschung konnten wir zeigen, dass die simultane Aktivierung von kokultivierten PDCs und naiven B-Zellen in einem T-Zellfreiem System nicht nur mit TLR9-, sondern auch mit TLR7-Liganden erzielt werden kann. Der natürliche Ligand von TLR7 ist bis dato noch nicht bekannt, allerdings sind einige synthetische Liganden identifiziert worden, die eine strukturelle Ähnlichkeit zu Nukleinsäuren gemeinsam haben. Hierzu zählen Imidazoquinoline (Imiquimod und R848) und Loxorubin (7-Allyl-7,8-dihydro-8-oxoguanosin) [32, 49]. Es existieren bereits einige Publikationen, die die Aktivierung von murinen B-Zellen über ihren TLR7-Rezeptor beschreiben [278, 279], allerdings konnte erst jüngst geklärt werden, über welchen Mechanismus und welche

Gegebenheiten vorliegen müssen, dass TLR7-Liganden humane B-Zellen aktivieren [199]. Ebenso wie der synthetische Stimulus des TLR9-Rezeptors, CpG-ODN, können TLR7-Liganden als starke IFN α -Induktoren in PDCs fungieren [198].

Auffallend war der Befund, dass für die Stimulation mit R848 die Anwesenheit der PDC zwingend erforderlich ist. Eine Erklärung bietet der Befund, dass das im System vorliegende IFN α versus PDC erstmals selektiv zur Expression von TLR7mRNA in B-Zellen führt und damit der B-Zelle ermöglicht wird, auf TLR7-Liganden zu reagieren [199]. Diese Daten demonstrieren folglich einen wesentlichen Unterschied in der Funktion von TLR7 und TLR9: die Funktion des TLR7 ist abhängig von der Anwesenheit von IFN α und, wie oben beschrieben, ist die Verknüpfung von TLR-Expression und IFN α auf die Funktion von TLR9 nicht anwendbar.

In der Tat stellte sich wiederum die Frage, ob R848 im Kokultursystem mit PDCs der naiven B-Zelle zum *Isotype-Switch* verhelfen kann. Aus eigenen Daten sowie aus der oben zitierten Veröffentlichung [199] geht hervor, dass R848 trotz fehlender B-Zell-Rezeptor-Stimulation die Differenzierung einer naiven B-Zelle fördern kann, allerdings die Produktion von IgG unter den gegebenen Bedingungen der Population von B-Gedächtniszellen vorenthalten ist [199]. Da der Differenzierungsprozess, wie gesehen, antigenunspezifisch ablaufen kann, sollte für einen eventuell zukünftigen klinischen Einsatz sowohl von exogenen als auch von natürlichen TLR7-Liganden bedacht werden, dass sich schon bestehende Autoimmunerkrankungen in ihrer Ausprägung verschlechtern können. Nachdem R848 jedoch die Differenzierung einer naiven B-Zelle zur IgG-seziernden Plasmazelle nicht unterstützen kann, halten sich die negativen Konsequenzen der TLR7-induzierten Autoreaktivität in Schranken.

IV.2.7. PDC-B-Zell-Interaktion - zum besseren Verständnis des Pathomechanismus des Systemischen Lupus Erythematoses

Die hier gezeigten Daten besitzen unbestreitbar eine große Bedeutung für die weitere Aufklärung des molekularen Pathomechanismus des systemischen Lupus Erythematosus (SLE), ein Prototyp von Autoimmunerkrankung, der über eine abweichende Toleranz gegenüber nuklearen Komponenten und über bedeutsame Umgestaltungsprozesse des Immunsystems charakterisiert ist [280, 281]. Des Weiteren ist die Erkrankung über hohe Titer an Autoantikörpern, die ein breites Spektrum an Spezifitäten abdecken, einschließlich Antikörper gegen doppelsträngige DNA, gekennzeichnet [280]. 1979 wurde bereits von einer IFN-Aktivität des Serums von Patienten, die an Autoimmuner-

krankungen wie SLE, Arthritis oder Sklerodermie leiden, berichtet [282]. Dieses Resultat wurde später in der Hauptsache für die Erkrankung SLE bestätigt. Es hat mehr als zwei Jahrzehnte Forschung in Anspruch genommen, die Funktion von $\text{IFN}\alpha\beta$ im Pathomechanismus von SLE zu verstehen. Hinweise zur Aufklärung wurden von Studien erbracht, die aufzeigten, dass Autoimmunerkrankungen unter der Therapie mit $\text{IFN}\alpha\beta$ auftraten [283] und die Existenz von zirkulierenden $\text{IFN}\alpha\beta$ -Induktoren im Blut von SLE-Patienten entdeckt wurde [284]. Überraschenderweise konnten im Blut von SLE-Patienten im Vergleich zu dem von gesunden Patienten jedoch nur ein geringerer Prozentsatz an PDCs detektiert werden [267], was entweder auf eine gesteigerte Migration von PDCs ins Gewebe und/oder in sekundäre Lymphorgane oder aber auf einen Phänotypwechsel, der durch die Aktivierung bedingt ist, hervorgerufen wird.

Die direkte Einbindung von $\text{IFN}\alpha$ in die Pathogenese von SLE wurde von Blanco et al. [267] vorgeschlagen, der zeigen konnte, dass das von SLE-Patienten gewonnene Serum die Aktivierung von myeloiden dendritischen Zellen als Antwort auf ein Übermaß an $\text{IFN}\alpha$ antreiben kann. Unreife DCs, die Selbst-Antigene auf ihrer Oberfläche tragen, sind für die Aufrechterhaltung einer peripheren Toleranz entscheidend, da sie Antigene präsentieren, die in Abwesenheit einer entsprechenden Kostimulation antigenspezifische T-Zellen in einen anergischen Zustand überführen. Unverminderte, $\text{IFN}\alpha$ -vermittelte Aktivierung von DCs, die Selbst-Antigene von apoptotischen Zellen präsentieren, scheint in einem Bruch der Toleranz bei Patienten mit einer genetischen Prädisposition für Autoimmunerkrankungen zu münden.

Für die charakteristische Eigenschaft von SLE, die Expansion autoreaktiver Plasmazellen, bieten die hier vorgestellten Daten einen Erklärungsansatz. Das von der PDC sezernierte $\text{IFN}\alpha$ leistet hierzu einen entscheidenden Beitrag [281]. Übereinstimmend mit der aufgestellten Hypothese sind die Resultate von zwei aktuellen Studien, die in murinen SLE-Modellen durchgeführt wurden und die einen engen Zusammenhang zwischen der Induktion von $\text{IFN}\alpha\beta$ und einer gesteigerten Anzahl von Plasmazellen sowie einer wahrnehmbaren Verschlimmerung der Erkrankung herstellen und bestätigen [285, 286]. Einige Szenarien sind vorstellbar, die zur Erklärung des Bruchs der B-Zelltoleranz und der Generierung von anti-DNA-Antikörpern in SLE dienen könnten:

1. Die unter dem Einfluss von $\text{IFN}\alpha$ ausgereiften DCs präsentieren CD4^+ -T-Zellen Autoantigene, die nach erfolgter klonaler Expansion nach dem klassischen Muster zur Differenzierung von autoantikörperproduzierenden B-Zellen beitragen [45]. Dies könnte zusätzlich durch einen direkten Effekt von $\text{IFN}\alpha$ auf B-Zellen verstärkt werden: erstens durch die Reduktion des Schwellenwertes

für die BCR-Aktivierung, zweitens durch die Förderung der Differenzierung von naiven B-Zellen sowie B-Gedächtniszellen zu Plasmazellen. $\text{IFN}\alpha$ könnte ebenso die Sekretion der Moleküle BlyS und APRIL in MDCs stimulieren, die neben der bedeutenden Funktion im Prozess des Ig-Klassenwechsels auch einen Überlebensfaktor für Plasmazellen darstellen.

2. B-Zellen werden ohne Beteiligung einer T-Zelle an der Stimulation sowohl über ihren B-Zellrezeptor als auch über ihren *Toll-like*-Rezeptor aktiviert, wie mit Immunkomplexen, die Chromatin beinhalten [287], oder wie die Daten der hier vorliegenden Arbeit gezeigt haben. Ein großer Prozentsatz (55-75%) aller Antikörper, die von frühen unreifen B-Zellen gesunder Individuen exprimiert werden, zeigen Selbstreaktivität, einschließlich Polyreaktivität und antinukleäre Spezifitäten [288]. Während selbstspezifische B-Zellen normalerweise während ihrer Entwicklung einer negativen Selektion unterliegen [288], könnten $\text{IFN}\alpha$ und/oder DCs, die in der Anwesenheit von $\text{IFN}\alpha$ ausgereift sind, die Differenzierung einiger dieser autoreaktiven Klone zu antikörperproduzierenden Plasmazellen erlauben. Die nachfolgenden Immunkomplexe würden dann den B-Zellaktivierungs-*Loop* vervielfachen und auf Dauer aufrechterhalten.

3. Eine weitere Option wäre, dass SLE-Patienten genetische Veränderungen, die nicht im Zusammenhang mit $\text{IFN}\alpha$ stehen und die das Überleben von autoreaktiven Klonen erlauben, in autoreaktiven B-Zellen aufweisen. $\text{IFN}\alpha$ könnte in der Folge an der Aktivierung und Differenzierung dieser Klone zu autoantikörperproduzierenden Plasmazellen beitragen.

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von B-Zellen eines SLE-Patienten ist die gleichzeitige Expression von CD38 und IgD. Es konnte bereits gezeigt werden, dass $\text{IFN}\alpha$ die Expression von CD38 auf der Oberfläche von B-Zellen *in vitro* induzieren kann [289]. Übereinstimmend mit den Resultaten der gerade zitierten Arbeit konnten sich in der hier vorliegenden Arbeit durch die Anwesenheit von PDCs und das unter den gegebenen Bedingungen von PDCs sezernierte $\text{IFN}\alpha$ Plasmazellen entwickeln, die über eine hohe Expression des Oberflächenmarkers CD38 gekennzeichnet sind. Das CD38-Expressionsniveau ist mit dem von humanen zirkulierenden oder im Gewebe vorliegenden Plasmazellen vergleichbar, was wiederum die Rolle von $\text{IFN}\alpha$ im Differenzierungsprozess einer Plasmazelle *in vivo* bestätigt.

IV.3. Gelatine-Nanopartikel

IV.3.1. Die strukturelle Beschaffenheit eines CpG-Oligonukleotids ist für eine Komponente der immunstimulatorische Potenz entscheidend

Wie bereits in der aktuellen Literatur beschrieben und teilweise unter Punkt **III.1.4** in der vorliegenden Arbeit näher betrachtet, spielt eine partikuläre Struktur des ODN für die Induktion von IFN α in PDCs eine entscheidende Rolle [206]. Bei der hier vorgestellten Studie wurde unser Prototyp der CpG-Klasse-A, 2216, eingesetzt, der über die beiden Sequenzelemente, zentrales Palindrom und PolyG-Enden [100], die für die Ausbildung von intra- und intermolekularen Bindungen verantwortlich gemacht werden, verfügt. Die spontan entstehenden und unter physiologischen Bedingungen stabilen partikulären Strukturen, die sich aus bis zu 30 CpG-A-Strängen zusammensetzen können [215], haben durchschnittlich einen Durchmesser von 20-100 nm [290]. Dies kommt der Größe eines Virus, einem natürlichen, IFN α -induzierenden Stimulus der PDC, gleich.

Die Hypothese, dass eine partikuläre Struktur mit dem Aktivierungsgrad der PDC, der sich auf die sezernierte Menge an IFN α bezieht, korrelierbar ist, wurde durch die Adsorption von CpG-B- oder CpG-C-ODN an Gelatine-Nanopartikel, die aufgrund ihrer positiv geladenen Oberfläche über elektrostatische Wechselwirkungen CpG-Oligonukleotide binden können, überprüft und bestätigt. Nicht nur die primäre Sequenz des CpG-Oligonukleotids, sondern auch der physikalische Aggregationszustand kontrolliert folglich die immunstimulatorische Potenz eines Oligonukleotids.

Eine beträchtliche Steigerung der IFN α -induzierende Aktivität, wie sie durch die partikuläre Formulierung von CpG-B- und CpG-C-ODN mit Gelatine-Nanopartikel erzielt wurde, konnte von weiteren Arbeitsgruppen mit abweichenden Formulierungsarten und anderen CpG-ODN-Sequenzen gleichfalls beobachtet werden: unter anderem kamen als Formulierungsagensatz kationische Liposomen [291], kationische Mikropartikel aus einem Polymilchsäure-Polyglykolsäure-Gemisch (cPLGA) [201], Polystyrol-Nanopartikel [206], Nanopartikel aus Protamin (fertiges Manuskript Kerkmann et al.) sowie Mikropartikel aus dem polykationischen Antibiotikum Polymyxin B, wie jüngst veröffentlicht [292], zum Einsatz. Auch eine sekundäre Struktur, die sich aus der primären Basenfolge eines ODN ergibt, wie ein selbstkomplementärer Bereich, der die Ausbildung eines Dimers oder einer *Hairpin*-Struktur am 3'-Ende der Sequenz ermöglicht [201, 218], erfüllt die Voraussetzung einer strukturellen Domäne, die an ein IFN α -induzierendes ODN gestellt wird. Eine Partikel-ähnliche Struktur kann folglich entweder über die Adsorption von CpG-ODN an Na-

nopartikel oder aber durch den Einsatz von ODN, die aufgrund einer palindromischen Basenfolge oder PolyGs selbst höhere Strukturen (ODN 2216 und M362) ausbilden, realisiert werden.

Unerwartet war die starke Hemmung der IFN α -Induktion nach Stimulation mit dem bereits partikulär vorliegenden ODN 2216 gebunden an Gelatine-Nanopartikel. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass die Menge an IFN α , die durch CpG-A alleine induziert wird, bereits die maximale Menge an IFN α ist, die durch keinen natürlichen oder synthetischen Stimulus mehr steigerungsfähig ist [100].

Des Weiteren entstehen durch die Adsorption von 2216 an Gelatine-Nanopartikel partikuläre Strukturen mit einem Durchmesser, der allem Anschein nach die optimale Größe zur Aufnahme und/oder Signalgebung überschreitet. Nach Messungen, die von Klaus Zwiorek, Pharmazeutische Technologie der LMU, München, mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) durchgeführt wurden, nimmt der Durchmesser der Gelatine-Nanopartikel durch Bindung von CpG-B- oder CpG-C-ODN nur geringfügig zu. Hingegen war ein beträchtlicher Größenzuwachs bei mit CpG-A beladenen Gelatine-Nanopartikeln beobachtet worden; die Partikel nahmen über die Zeit gesehen stetig an Größe zu - von annähernd 10 μm bis zur sichtbaren Ausfällung eines Aggregates, was eine Größe im Millimeterbereich impliziert. Einem ODN, das durch Verleihung einer partikulären Struktur die Größe der zu aktivierenden Zelle übersteigt, ist die Immunstimulation einer Zelle, möglicherweise aufgrund fehlender Internalisierung, untersagt [293].

Neben der strukturgebenden Komponente ist jedoch eine „stimulatorische Domäne“ mit CpG-Motiven für die IFN α -induzierende Kapazität eines ODN nicht zu vernachlässigen. Dies beweist in der hier vorliegenden Studie das Kontroll-ODN M383, welches das korrespondierende GC-Pendant zum ODN M362 darstellt und trotz partikulärem Charakter durch die Adsorption an Gelatine-Nanopartikel keine immunstimulatorische Aktivität aufweist. Infolgedessen sollte eine Oligonukleotidsequenz, die zur Aktivierung einer humanen PDC bestimmt ist, sowohl über eine stimulatorische als auch eine strukturelle Domäne verfügen. Im Gegensatz dazu scheint für die Aktivierung von B-Zellen vorrangig die Sequenz entscheidend und eine partikuläre „Gestalt“ des Oligonukleotids tendenziell für die stimulatorische Aktivität nachteilig zu sein.

IV.3.2. Liganden-abhängige Rezeptor-Aggregation als Erklärung für die Steigerung der IFN α -Sekretion

Ein möglicher Erklärungsansatz für die beobachtete Signalverstärkung beruht auf der Vorstellung, dass die dichte, räumliche Anordnung von CpG-Motiven auf der Oberfläche des Gelatine-Nanopartikels zum *Clustering* und *Crosslinking* des CpG-Rezeptors TLR9 führt. Die Vermittlung eines Signals durch die Interaktion eines einzelnen Rezeptor-Moleküls mit einem einzigen Liganden stellt ein sehr vereinfachtes Modell der tatsächlichen Situation dar. Mit einer bildgebenden Untersuchungsmethode wurden die genauen Abläufe zwischen T-Zelle und dendritischer Zelle zu Beginn einer antigenspezifischen Immunreaktion aufgeklärt; die hierbei entstandenen Resultate prägten ein neues Bild einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung [294]. Eine Vielzahl von Rezeptoren akkumuliert in den meisten Fällen in definierten Bereichen der Zellmembran, die als *lipid rafts* bezeichnet werden [295]. Die erhöhte Dichte an Rezeptormolekülen in Mikrodomänen der Zellmembran wird als *clustering* bezeichnet und ermöglicht bei einer Interaktion mit einem multimeren Stimulus entweder erstmals ein Signal oder führt zu einer Verstärkung eines bereits bestehenden Signals [296].

Im Falle eines mit CpG-Oligonukleotid beladenen Nanopartikels oder des natürlichen Liganden, der bakteriellen DNA, werden in unmittelbarer räumlicher Nähe viele CpG-Motive präsentiert, die zum *Crosslinken* der in *lipid rafts* akkumulierten Rezeptoren führen könnten; die Signaltransduktion wird in der Folge verstärkt oder verändert. Alternativ kann angenommen werden, dass die Bindungsenergie, die bei der Interaktion eines einzigen CpG-Oligonukleotids mit TLR9 frei wird, so gering ist, dass die gesteigerte Avidität, die über multivalente Moleküle möglich wird, für ein optimales *Signaling* notwendig ist [297]. Die beschriebenen Annahmen führen zur folgender Spekulation über die TLR9-ODN-Interaktion: die Rezeptoraggregation scheint eine wesentliche Komponente der TLR9-Aktivierung, vor allen Dingen für die nachfolgende Auslösung des *Pathway*, der zur Expression von IFN α führt, zu sein. Die Aufklärung des genauen Mechanismus des TLR9-*Signalings* erfordert allerdings entsprechende Studien, die die Rezeptor-Ligand-Interaktionen genau untersuchen. Für die Auslösung des TLR4-*Signaling* wurde ein analoger Mechanismus vorgeschlagen [298].

Zusätzlich wird die Annahme durch die Tatsache bekräftigt, dass TLRs eine strukturelle Homologie zu IL-1-Rezeptoren besitzen. Studienergebnisse, die auf der Methode des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers beruhen, demonstrierten einen engen Zusammenhang zwischen der Fähigkeit des Polypeptids IL-1 α , die Aggregation des korrespondierenden Rezeptors auszulösen, und der Stimulation einer bestimmten, funktionellen Reaktion, in diesem Fall der Produktion von PGE₂ [299]. Der zur Behandlung der rheumatischen Arthritis eingesetzte IL-1-Rezeptor-Antagonist Anakinra (Kineret®), dessen Wirkung auf einer kompetitiven Rezeptorblockade beruht, verursacht

bei der Interaktion mit seinem korrespondierenden Rezeptor keine Rezeptoraggregation [300]. In Analogie dazu ist vorstellbar, dass die biologischen Effekte einiger ODN einem ähnlichen Mechanismus unterliegen. Mit dieser Theorie übereinstimmend ist der Befund, dass das CpG-B-ODN 2006, das unter normalen Kulturbedingungen in monomerer Form vorliegt, nur in schwachem Maße die PDC zur Sekretion von IFN α anregen kann. Eine synergistische Wirkung bezüglich der Induktion von IFN α bei einer kombinierten Stimulation mit 2006 und 2216 blieb jedoch aus; es ist vorstellbar, dass in diesem System 2006 wie ein Antagonist wirkt (nicht gezeigte Daten).

Die multimere Präsentation von CpG-Motiven und das damit verbundene *Crosslinken* von Rezeptoren ist eine mögliche Begründung für die verstärkte Induktion von IFN α in PDCs. Dieser Befund wird auch mit Daten, die von anderen Arbeitsgruppen erhoben wurden, unterstützt [201, 292, 300]. Weitere, durch CpG-ODN hervorgerufene Merkmale einer PDC-Aktivierung, wie die gesteigerte Expression von kostimulatorischen Molekülen oder die Sekretion von TNF α , blieb von der polyvalenten Präsentation von CpG-Motiven unbeeinflusst (nicht gezeigte Daten). Diese Divergenz deutet auf unterschiedliche *Pathways* hin, die von einem aktivierten TLR9 initiiert werden. Die Präsentation von ODN in partikulärer Form, die zahlreiche Rezeptor-Ligand-Kontakte ermöglicht, amplifiziert selektiv den *Pathway*, der zur Transkription von IFN α führt.

IV.3.3. Verstärkte Aufnahme als ein Grund für die gesteigerte IFN α -Sekretion?

Bei Hinterfragung des beschriebenen Phänomens - der beträchtlichen Steigerung der IFN α -Induktion durch partikuläre Präsentation von CpG-Motiven – war es nahe liegend, den Aspekt einer verstärkten Aufnahme in die PDC im Vergleich zur ungebundenen Form zu betrachten.

Mittels einer FACS-Analyse erfolgte die Untersuchung der Aufnahme in aufgereinigte PDCs und B-Zellen (nicht gezeigte Daten). Hierbei konnte kein Unterschied in der Aufnahme zwischen ODN 2216, 2006 und an Nanopartikel gebundenes ODN 2006/M362 festgestellt werden. Diese Untersuchungsmethode ist mit einigen, nicht vermeidbaren Fehlern behaftet, die das gesehene Resultat verfälschen könnten: trotz gewissenhafter Waschschriffe nach festgelegter Inkubationszeit mit dem jeweiligen FITC-gelabelten ODN kann die Adsorption des ODN oder des mit ODN beladenen Nanopartikels auf der Oberfläche der PDC nahezu nicht ausgeschlossen werden. Diese Fehlerquelle kann durch eine Kontrollbedingung, die während der gesamten Versuchszeit auf Eis gelagert wird, in seiner Ausprägung abgeschwächt werden. Unter der Voraussetzung einer 4°C-Inkubation werden alle physiologischen Prozesse, einschließlich einem endozytotischem Vorgang, stark einge-

schränkt. Erst die Differenz der *mean fluorescence intensity* (MFI) zur Eisprobe erlaubt eine Aussage über die tatsächlich aufgenommene Menge an ODN oder ODN beladener Nanopartikel.

Die Arbeitsgruppe um K. Fearon erklärt sich die verstärkte immunstimulatorische Potenz von kurzen ODN-Sequenzen adsorbiert an cPLGA-Mikropartikel über eine gesteigerte Aufnahme, quantifiziert allerdings nicht die aktuell internalisierte Menge an CpG-Oligonukleotid [201]. Auch von einer in Liposomen gebundenen Form eines ODN wird geschildert, dass sie die Aufnahme um einige Potenzen im Vergleich zur ungebundenen Form steigern kann [301]. Hingegen existieren einige Publikationen, die von der Aufnahmerate eines partikulär formulierten ODN Gegenständliches behaupten [206, 292]. Zusammengefasst scheint, dass, trotz nachgewiesener Steigerung der Aufnahme, auf Grundlage der bestehenden Daten eine vermehrte Aufnahme nicht eindeutig mit einer gesteigerten Immunstimulation korrelierbar ist.

Der Unsicherheitsfaktor einer Adsorption von CpG-ODN auf der Oberfläche der betrachteten Zelle kann mit einer konfokalmikroskopischen Betrachtung umgangen werden. Die Konfokalmikroskopie eröffnet die Möglichkeit einer dritten Dimension; aufgrund der *pinholes*, die als konfokale Blende wirken, entstehen optische Schnitte, die frei von Streulicht sind und zur tiefenscharfen Projektion zusammengesetzt werden können. Hiermit kann eine eindeutige Aussage über die Aufnahme qualitativ, jedoch nicht quantitativer Art, getroffen werden. Außerdem könnte durch Markierung ausgewählter Zellorganelle der genaue Ablauf sowie die Lokalisierung des ODN im Unterschied zu ODN-beladenen Nanopartikeln verfolgt werden, was zur weiteren Aufklärung des gesehenen Effekts beitragen würde.

Eine über das Resultat mitentscheidende Voraussetzung der Konfokalmikroskopie ist die korrekte Präparation der Probe; dafür müssen die zu untersuchenden Zellen adhärent sein. Plasmazytoide dendritische Zellen zählen jedoch nicht zu den Populationen von adhären Zellen. Drei alternative Methoden wurden ausgetestet, um PDCs in einen adhären Zustand zu überführen: 1. Kultivierung der PDC in einem ausgewählten Medium nach [112], 2. Beschichtung der Kulturgefäße mit bivalenten Kationen und/oder Proteinen (Poly-D-lysin, Matrigel®) und 3. schneller Zentrifugationsschritt, der zu schwach adhären, aber stark deformierte PDCs führt. Keine der drei Varianten zur Probenvorbereitung führten zu einem zufriedenstellenden Ergebnis. Folglich wurden Versuche mit PDCs, die sich in Zellsuspension befanden, den bekannten Nachteilen bewusst, vorgenommen. Eine Anreicherung von FITC-markierten Oligonukleotiden aller drei CpG-Hauptklassen in der PDC konnte nach wenigen Minuten Stimulation beobachtet werden (Abb. 25).

Für die Aufnahme von mit ODN beladenen Nanopartikeln blieb hingegen ein Ergebnis bzw. Nachweis aus, was unter anderem auf eine unzureichende Probenpräparation zurückzuführen ist.

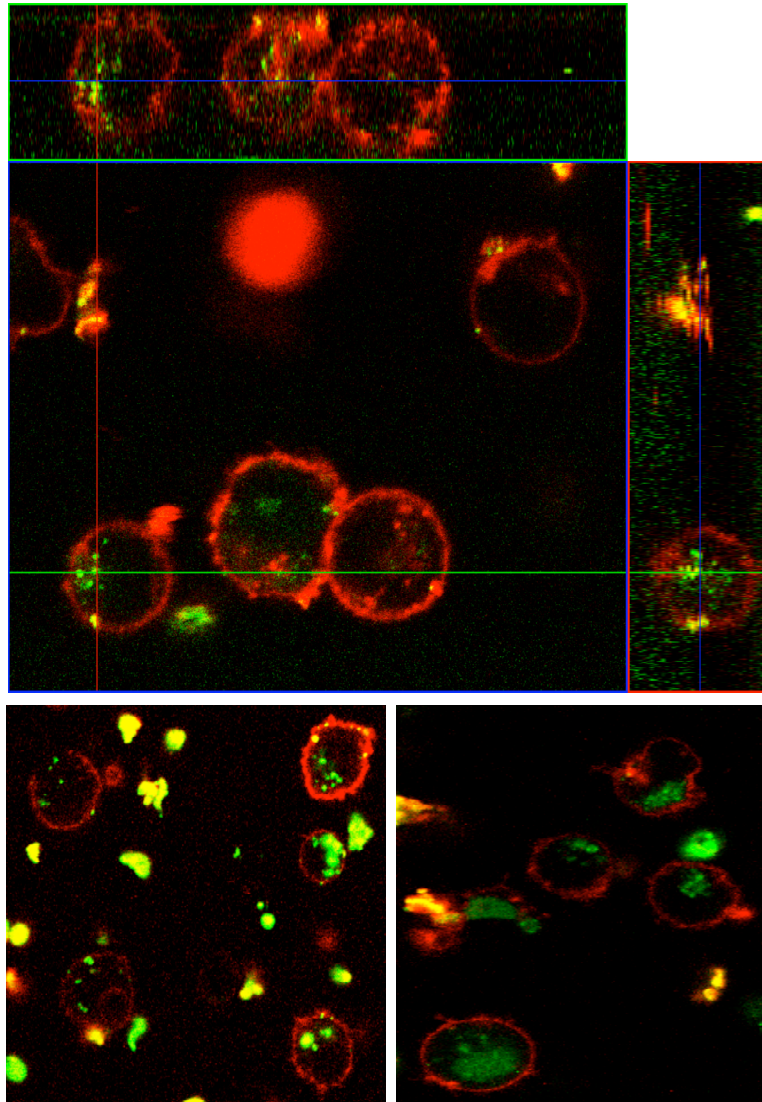


Abbildung 25 Konfokalmikroskopische Aufnahmen von PDCs nach Stimulation mit FITC-markiertem CpG-ODN. PDCs ($2,5 \times 10^5$ PDCs /ml) wurden in für das Konfokalmikroskop geeignete *chamber-slides*[®] mit IL-3 (10 ng/ml) und einer CpG-Nanopartikel-Dispersion (3 μ g/ml) im Brutschrank für 10 Minuten in Kultur gegeben (CpG-C M362: oberes Bild; CpG-A 2216: unten, linkes Bild; CpG-B 2006: unten, rechtes Bild). Nach entsprechenden Färbe- und Waschschrritten (siehe Material & Methoden, **II. 2.5.2.**) wurden die Zellen mit einem Konfokalmikroskop gesichtet.

Anhand der bis dato existierenden Daten ist die Potenzierung der IFN α -Synthese durch Kopplung von CpG-ODN an Gelatine-Nanopartikel nicht mit einem quantitativen Unterschied in der Aufnahme korrelierbar. Auffällig war bei der Auswertung des *uptake*-Versuches, vor allem bei Betrachtung der konfokalen Aufnahmen, der Befund, dass zwischen den einzelnen Vertretern der drei

CpG-Klassen visuell keine großen Unterschiede in der aufgenommenen Menge festgestellt werden konnten, wie auch eine Aussage in der Veröffentlichung [206] lautet. Damit wird die vor einiger Zeit postulierte Annahme zum Teil entkräftigt, dass ODN, die ein PolyG-Motiv in ihrer Sequenz aufweisen, wie ODN 2216, aufgrund dieser Tatsache besser aufgenommen werden und folglich eine verstärkte Aktivität zeigen [114, 302].

Einige Arbeitsgruppen beschreiben, dass ODN mit PolyG-Motiven von Scavenger-Rezeptoren erkannt werden und somit besser in die Zelle internalisiert werden [302]. Dieser Befund ist jedoch nur für die Zellpopulation von Makrophagen, Monozyten und murine CD11c⁺ DCs bewiesen [114, 303]. Neueste Resultate besagen, dass PDCs keine Scavenger-Rezeptoren exprimieren (nicht publizierte Daten, S. Rothenfusser). Folglich kann die abweichende IFN α -induzierende Potenz von CpG-A-ODN, die von ODN-beladenen Nanopartikeln imitiert wird, und dem CpG-B-ODN 2006 wahrscheinlich nicht auf unterschiedliche Aufnahmearten zurückgeführt werden.

IV.3.4. Allein die Sequenz bestimmt den Grad der B-Zellaktivierung

Obleich die Aufnahme von CpG-ODN in komplexer, partikulärer Form wie auch die der singulären Form in B-Zellen nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigte Daten), konnte nicht nur kein Anstieg, sondern abhängig von der Größe des eingesetzten naiven Nanopartikels sogar eine starke Reduktion der immunstimulatorischen Aktivität gezeigt werden. In den Zellkulturüberständen, die mit ODN-beladenen Nanopartikeln stimuliert wurden, wurden IL-6-Konzentrationen in dem Mengbereich detektiert, wie sie mit CpG-A-ODN 2216 erzielt werden.

Von einer annähernd analogen Ungleichheit in der Immunantwort der reagierenden Zellpopulationen wurde beim Vergleich der zwei Hauptklassen von immunstimulatorischen CpG-ODN, CpG-A und CpG-B, bereits in der hier vorliegenden Arbeit berichtet. Die beladenen Gelatine-Nanopartikel entsprechen zugegebenermaßen nicht den chemischen bzw. Sequenz-Anforderungen, die für CpG-A-ODN (palindromisches Sequenzelement, chimäres Rückgrat, PolyG-Enden) definiert wurden, zeigen dennoch ein vergleichbares Aktivitätsmuster. Diese Resultate weisen daraufhin, dass eine multimere Präsentation von CpG-Motiven entweder durch Adsorption von ODN-Sequenzen an einen Träger oder durch Aggregation des ODN, die durch die primäre Basenfolge bedingt ist, wie anhand der Sequenz von 2216 gezeigt [206], die IFN α -Sekretion über alle anderen immunstimulatorischen Aktivitäten stellt. Die Voraussetzungen, die an die Präsentationsform der immunstimulatorischen CpG-Motive zur Induktion von IFN α gestellt werden, sind von den Anforderungen, die

einer optimalen B-Zell-Aktivierung bedürfen, abweichend; dies lässt wiederum auf einen signifikanten Unterschied schließen, auf welche Weise die beiden Zellpopulationen CpG-Oligonukleotide erkennen. Gründe für die erhobene Annahme können unterschiedlichen Ursprungs sein: 1. es wäre denkbar, dass polymorphe Formen des Rezeptors TLR9 in PDCs und B-Zellen existieren, die unterschiedliche, strukturelle Voraussetzungen an ihren Liganden stellen; 2. eine Heterodimerisierung von TLR9 mit einem weiteren Mitglied der TLR-Familie für jeweils eine der immunstimulatorischen Aktivitäten notwendig ist; 3. ein noch nicht identifizierter CpG-Co-Rezeptor oder Adaptermoleküle, die nur in einer der beiden TLR9-tragenden Zellpopulationen exprimiert werden, noch entdeckt werden oder 4. TLR9 sich in unterschiedlichen Kompartimenten des Endosoms befinden kann.

Die Aktivierung von B-Zellen wird folglich vorherrschend durch die Sequenz des Oligonukleotids bestimmt. Dies bestätigt eine weitere Studie, in der sogenannte CICs (*chimeric immunomodulatory compounds*) zur Immunstimulation von B-Zellen eingesetzt wurden. Hierbei handelt es sich um heptamere ODN, die über nicht-nukleosidische Abstandhalter verknüpft werden [297]. Über die Dimension der Stimulation entscheidet wiederum die Basenkombination am 5'-Ende der Sequenz, der Konfigurationszustand des CICs, der durch den eingesetzten *Spacer* bedingt ist, hat hingegen nur einen marginalen Einfluss. Wie schon in die Definition der sequenzspezifischen Anforderungen an die ODN der CpG-Klasse C eingegangen ist, ist ein 5'-TCG gefolgt von einem weiteren Thymin für das B-Zellspezifische Aktivitätsmuster am besten geeignet.

Der Aktivierungsgrad der B-Zelle ist über die Adsorption von CpG-B- oder C-ODN an unterschiedliche Größen von Nanopartikeln steuerbar. Eine Spanne von 10-50%iger B-Zellaktivierung im Vergleich zur monomeren Form ist durch die Formulierungsart bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung hoher Konzentrationen an IFN α abdeckbar. Dies könnte insbesondere bei der Behandlung bestimmter Erkrankungen von Nutzen sein, die von einer IFN α -vermittelten Immunantwort, jedoch nicht von einer polyklonalen B-Zellstimulation, profitieren. Bei einem klinischen Einsatz zur Behandlung von allergischem Asthma oder ausgewählter Tumorerkrankungen wäre es wünschenswert, eine polyklonale B-Zellaktivierung, die in einer Potenzierung von Asthma-vermittelnden B-Zellen oder in B-Zelllymphomen resultieren könnte, zu unterbinden. So hat die Bindung von CpG-ODN an einen Nanopartikel gegenüber dem entsprechenden, konventionellen ODN, in der klinischen Anwendung einen bedeutenden Vorteil, wenn nur ein eingeschränktes Set an immunstimulatorischen Aktivitäten erforderlich ist.

IV.3.5. Vorteile einer Formulierung von immunstimulatorischen CpG-Oligonukleotiden in Anbetracht einer klinischen Anwendung

Außer der Absicht mit den Untersuchungen von ODN-beladenen Nanopartikeln die strukturellen Voraussetzungen, die an IFN α -induzierende CpG-Oligonukleotiden gestellt werden, aufzuklären, lag ein weiterer Schwerpunkt dieser Studie in der Suche nach einer Formulierung für Oligonukleotide mit dem Ziel einer verbesserten Stabilität und Bioverfügbarkeit *in vivo*. Ein signifikanter Nachteil von Nukleinsäuren, deren therapeutischer Einsatz überlegt wird, liegt in der Instabilität unter physiologischen Bedingungen. Das einzigste weltweit zugelassene therapeutische Oligonukleotid Formivirsen (Vitravene®), das zur Behandlung einer Zytomegalie-Retinitis bei AIDS-Patienten angewandt wird, muss direkt an seinen Bestimmungsort, lokal in den Glaskörper, appliziert werden.

Da die biologischen Effekte von ODN, die *in vitro* nachgewiesen wurden, bei der Übertragung in ein *in vivo*-System aufgrund kurzer Halbwertszeiten nicht nur begrenzt sind, sondern teilweise ausbleiben, müssen Wege zur Lösung dieses Problems gefunden werden, den längeren Verbleib von ODN am Ort des Geschehens zu gewährleisten. Ein kleiner Fortschritt in die richtige Richtung wurde bereits durch eine abgeänderte Rückgrat-Chemie des ODN erzielt. Durch den Austausch eines an der nukleosidischen Bindung nicht beteiligten Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom entsteht ein Phosphorothioat-ODN, das resistenter gegenüber endogenen Nukleasen und Proteasen ist und aufgrund dessen die Plasmahalbwertszeit im Vergleich zu einem Phosphodiester-ODN von fünf Minuten auf bis zu eine Stunde erhöht [304]. Eine zusätzliche Option, die zur Verbesserung der Stabilität von stimulatorischen Nukleinsäuren gegenüber enzymatischer Degradierung und somit zu einer gesteigerten Bioverfügbarkeit beiträgt, ist die Bindung von Oligonukleotiden an kationisierte, partikuläre Trägersysteme, wie Nanopartikel, Liposomen oder Mikropartikel [305]. In der Tat konnte gezeigt werden, dass Trägersysteme die Wirkung von ODN steigern [306]. Diesem Resultat fehlt noch eine *in vivo*-Bestätigung für die hier vorgestellten Gelatine-Nanopartikel.

Bei der Auswahl des Trägersystems sollten gewisse Voraussetzungen an den Ausgangsstoff in Anbetracht einer künftigen klinischen Anwendung erfüllt werden. Gelatine als Ausgangssubstanz hat den Vorteil einer guten und bereits langjährig erprobten Verträglichkeit, zeigt eine schwache Eigen-Antigenizität und ist vor allen Dingen biokompatibel und auch biodegradierbar ohne Bildung von toxischen Abbauprodukten. Viele synthetische Polymere, die zur Herstellung von partikulären Systemen eingesetzt werden, haben den Nachteil, dass sie nicht bioabbaubar sind und somit je nach Beurteilung des Ausgangs einer toxikologischen Untersuchung nur bedingt für me-

dizinische Zwecke einsetzbar sind oder aber der klinische Einsatz aufgrund eines beträchtlichen Nebenwirkungsprofils nicht vertretbar ist. Hierzu zählen z.B. als Ausgangsmaterial die Polymere Polystyrol oder Polyhexylcyanoacrylat. Auch die Anwendung des polykationischen Antibiotikum Polymyxin B zur Ausbildung von Mikropartikeln ist kritisch zu bewerten [292]. Trotz Einsatz geringer Mengen an Polymyxin B zur Herstellung im Vergleich zu den Gaben, die zur Erzielung eines antibakteriellen Effekts notwendig sind, sind die renalen und neurologischen Toxizitäten, die bei Anwendung von Polymyxin B am Menschen beobachtet wurden, bei der Bewertung nicht außer Acht zu lassen [307].

Es ist vorstellbar, dass durch die Adsorption einer Vielzahl von ODN auf der Oberfläche eines Nanopartikels eine Art „ODN-Depot“ geschaffen wird. Die gebundenen ODN können an ihrem Bestimmungsort kontinuierlich freigesetzt werden; auf diesem Wege sind über eine längere Zeitspanne CpG-Motive im Endosom der PDC allgegenwärtig, die den IFN-Rezeptor-vermittelten, autokrinen *Feedback-loop* aktivieren können, der ebenfalls durch die Vertreter der CpG-A-Klasse angeregt wird [37]. Diese Annahme bietet einen weiteren Ansatz zur Erklärung der gesteigerten IFN α -Induktion durch an Nanopartikel gebundenes ODN.

Interferon- α , das in den hier vorgestellten *in vitro*-Studien nach Stimulation mit beladenen Gelatine-Nanopartikeln selektiv in beträchtlichen Mengen von PDCs sezerniert wurde, ist ein wesentliches Effektormolekül sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunität. Es existiert ein breitgefächertes Wissensspektrum über die immunstimulatorischen Potenz von IFN α , auf dem die feste Platzierung von rekombinantem IFN α in einigen Therapierichtlinien ausgewählter Erkrankungen, wie dem malignen Melanom oder als Kombination mit Ribavirin bei Hepatitis-C-Infektionen, begründet ist. Jedoch ist die „Einnahme“ der zugelassenen IFN α -Präparaten, wie Intron A®, aufgrund der Instabilität des Proteins für den Patienten mit einigen Nachteilen, wie der i.v.-Applikation, behaftet. Es wird stetig nach Zubereitungsformen für IFN α gesucht, die eine patientenfreundlichere, eventuell orale Applikationsform ermöglicht. Deshalb ist ein attraktiver und zu berücksichtigender Forschungsansatz die Entwicklung von endogenen IFN α -Induktoren.

Zu den endogenen IFN α -Induktoren können neben CpG-A-ODN auch die hier präsentierten, mit ODN-beladenen Nanopartikel gezählt werden. Sie verfügen über den Vorteil einer genau definierbaren Charakterisierung. Bei Einhaltung eines optimierten Herstellungs-, Aufreinigungs- und Beladungsprotokolls ist die Produktion eines jeweils identischen Partikels sowohl in Bezug auf die Partikelgröße als auch auf die Beladungskapazität des Partikels mit ODN gewährleistet. Das CpG-

A-ODN 2216 hingegen stellt ein Gemisch unterschiedlicher sekundärer und tertiärer Strukturen dar, die sich aus einer variablen Anzahl von Einzelmolekülen zusammensetzen [206]. Das in seinen Bestandteilen nicht-definierte Gemisch unterliegt zusätzlich einer schnellen Änderung seiner Zusammensetzung bedingt durch äußere Einflüsse, wie ein Gefrier-Tau-Zyklus oder Erwärmen. Folglich stößt man bei der Ausarbeitung von Qualitätskontrollprotokollen für 2216 auf Schwierigkeiten: es muss nicht nur die Länge und die korrekte Basenfolge des Einzelmoleküls sichergestellt werden, sondern auch das beträchtliche Spektrum an unterschiedlichen Partikelgrößen ist zu quantifizieren und zu standardisieren.

CpG-ODN sind vielversprechende Immunadjuvantien, die eine antigenspezifische Immunantwort gegen eine Vielzahl von Antigenen signifikant steigern können. Im Gegensatz zu den herkömmlich eingesetzten Adjuvantien (Aluminiumverbindungen) lenken CpG-ODN, wie auch der „Goldstandard“, das vollständige Freund'sche Adjuvans (CFA), die Immunantwort in die gewünschte Richtung eines Th1-Phenotyps (CTL, IFN γ -Produktion, entsprechendes Ig-Profil) [94, 308]. Eine optimale Immunogenität wird dem ausgewählten Antigen verliehen, sobald eine enge, räumliche Nachbarschaft von Adjuvans und Antigen besteht; diese erforderliche physikalische Nähe kann durch die Bindung von ODN und Antigen an einen gemeinsamen Träger hergestellt werden. In einem murinen Vakzinierungsmodell erzielte die Verabreichung eines Nanopartikels, der sowohl mit ODN als auch mit dem entsprechenden Antigen beladen war, eine signifikant gesteigerte Immunreaktion im Vergleich zur separaten Verabreichung der beiden entscheidenden Vakzine-Bestandteilen [309]. Weitere Publikationen konnten mit abweichenden Trägersystemen vergleichbare Ergebnisse generieren [310-312]. Dieses Modell des Einsatzes eines partikulären Systems, das sowohl Antigen als auch Adjuvans der gleichen Zelle liefert, dient nicht nur der Potenzierung der Immunreaktion, sondern auch der Reduktion der eingesetzten Menge an ODN [313] sowie dem Schutz einiger Antigene vor dem Abbau durch lysosomale Enzyme [314].

Die hier vorgestellten Gelatine-Nanopartikel bieten gleichfalls die Möglichkeit Antigene an die Oberfläche des Partikels zu binden. Die Oberfläche der Partikel bietet durch Tausende von freien Seitenketten der Gelatine-bildenden Aminosäuren chemisch leicht zugängliche Bindungsstellen, die eine kovalente Kopplung eines Antigens ermöglichen. Des Weiteren ermöglichen etablierte Methoden der Proteinchemie die kovalente Bindung von *drug targeting*-Liganden, wie spezifische Antikörper, auf die Oberfläche von Nanopartikeln. Das dabei entstehende Transportsystem zeichnet sich über eine hohe Spezifität für seinen Bestimmungsort aus. Jüngst veröffentlicht wird durch die Bindung eines biotinylierten anti-CD3-Antikörpers über die Ausbildung eines Avidin-Biotin-Komplexes gewährleistet, dass das Trägersystem in diesem Fall spezifisch von der Population der

T-Zellen erkannt wird [315]. Gelatine-Nanopartikel als Trägersystem eröffnen folglich ein großes Spektrum an Modifikationsmöglichkeiten: einerseits ermöglicht die positivierte Oberfläche die Adsorption negativ geladener Moleküle wie die von immunstimulatorischen CpG-ODN oder anderer therapeutischer Nukleinsäuren wie siRNA [316], andererseits besteht die Option Antigene oder aber spezifische Leitsubstanzen kovalent zu binden.

V. Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit ist es uns gelungen, CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN) zu identifizieren, die die immunstimulatorischen Eigenschaften von CpG-A- und CpG-B-ODN kombinieren: die neuen Oligonukleotid-Sequenzen, die unter dem Begriff CpG-C zusammengefasst werden, stellen nicht nur eine optimale Stimulationsquelle für B-Zellen dar, sondern verfügen – im Gegensatz zu CpG-B-ODN – auch über das Potential, in plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) große Mengen an Interferon-alpha zu induzieren. CpG-C-ODN übertreffen in ihrer Stimulationskraft aufgrund einer direkten und indirekten, über Zytokine vermittelten B-Zellaktivierung das Potential von CpG-B-ODN. Neben der funktionellen Charakterisierung, die mit den beiden TLR9-tragenden Zellpopulationen in *in vitro*-Versuchen vorgenommen wurde, konnten bei einem direkten Vergleich der Immunstimulation von ausgewählten Kontroll-Oligonukleotiden und dem Prototyp der CpG-C-Klasse, M362, zusätzlich sequenzspezifische und strukturelle Voraussetzungen für jeweils einen Arm des immunstimulatorischen Aktivierungsprofils von CpG-ODN erarbeitet werden: über die Auslösung einer Signaltransduktionskaskade, die in einer B-Zellstimulation mündet, entscheidet primär die ODN-Sequenz. Hingegen ist eine höhermolekulare Struktur, die sich aufgrund der primären Basenabfolge eines Oligonukleotids ergibt, für das Interferon-alpha-induzierende Potential eines Oligonukleotids entscheidend. Diese Annahme konnte mit den Ergebnissen, die mit der Bindung von CpG-C-ODN M362 an die Oberfläche von positiv geladenen Gelatine-Nanopartikeln generiert wurden, bestätigt werden. Allen Sequenzen der neuen CpG-C-Klasse ist gemeinsam, dass sie entsprechend ihrem Aktivierungsprofil sowohl über einen selbstkomplementären Sequenzbereich verfügen, der dem Oligonukleotid eine sekundäre Struktur verleiht und somit über das Ausmaß der Interferon-alpha-Sekretion der plasmazytoiden dendritischen Zelle bestimmt, als auch über eine entsprechende Basenzusammensetzung, die für eine optimale B-Zellaktivierung ausschlaggebend ist (freies 5'-TCG, humanes CpG-Motiv) (Tab. 7). Der Einblick in die Anforderungen, die an eine ODN-Sequenz für das jeweilige immunstimulatorische Aktivierungsmuster gestellt werden, sowie die Kenntnis über die beiden CpG-sensitiven Zellpopulationen bieten nun die Voraussetzung, ein optimiertes Oligonukleotid mit entsprechendem Aktivierungspotential zu entwickeln.

Oligonukleotide, die der CpG-Klasse C angehören, könnten für die Immuntherapie große Bedeutung erlangen: zum einen ist der Einsatz von CpG-C-ODN als Vakzineadjuvans vorstellbar, wofür sich Oligonukleotide der CpG-Klasse B bereits sehr bewährt haben. Zum anderen stellen die Vertreter der neuen CpG-Klasse aufgrund ihrer Fähigkeit, das antivirale Zytokin Interferon-alpha zu induzieren, vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung von Immunmodulatoren dar, die

sowohl zur Behandlung als auch zur Prävention einer Infektionserkrankung eingesetzt werden könnten.

	CpG-A	CpG-B	CpG-C
<i>primäre Zielzelle</i>	PDC	PDC und B-Zelle	PDC und B-Zelle
<i>Prototyp</i>	ODN 2216	ODN 2006	ODN M362
<i>funktionelle Charakteristika</i>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ induziert sehr hohe Mengen Typ-I-IFN in PDCs ◆ keine Aktivierung von B-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ induziert sehr geringe Mengen an IFN-Typ-I in PDCs, aber starke Expression von kostimulatorischen Molekülen ◆ starke Aktivierung von B-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ induziert hohe Mengen an IFN-Typ-I in PDCs ◆ Expression kostimulatorischer Moleküle ◆ starke Aktivierung von B-Zellen
<i>strukturelle Charakteristika</i>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Poly-G-Enden ◆ zentrales Palindrom mit CpG-Motiv ◆ chimäres Rückgrat ◆ Ausbildung sekundärer und tertiärer Strukturen (partikuläre Strukturen) 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ optimales „humanes CpG-Motiv“ ◆ Phosphorthioat-Rückgrat ◆ keine Ausbildung sekundärer Strukturen 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ zentrales Palindrom mit CG-Dinukleotiden ◆ 5' TCG-Ende und „humanes CpG-Motiv“ ◆ modifiziertes Phosphorthioat-Rückgrat ◆ Ausbildung dimerer Strukturen

Tabelle 7 Charakteristische Eigenschaften der humanen CpG-ODN-Klassen im Überblick

Der Prototyp der neuen CpG-Klasse M362 führt zur optimalen Aktivierung beider TLR9-tragenden Zellpopulationen, B-Zellen und plasmazytoide dendritische Zellen, und stellt demzufolge ein geeignetes Werkzeug zur Untersuchung der funktionellen Konsequenz einer TLR-vermittelten Stimulation dieser beiden Zellpopulationen dar. Zusätzlich zu der Stimulationsweise mit dem neuen CpG-C-ODN M362 ist an dem Kokultursystem bedeutsam, dass der direkte Einfluss der plasmazytoiden dendritischen Zelle auf den Differenzierungsprozess einer B-Zelle bis *dato* noch nicht untersucht wurde. Mit den in der hier vorliegenden Arbeit dargestellten Befunden kann der plasmazytoiden dendritischen Zelle erstmals eine Rolle in der humoralen Immunreaktion zugesprochen werden. Wir konnten zeigen, dass in Anwesenheit einer plasmazytoiden dendritischen Zelle eine Stimulation mit dem CpG-C-ODN M362 und dem B-Zellrezeptorantigen anti-Ig für die Differenzierung einer naiven B-Zelle zur Plasmazelle, die IgM produziert und sezerniert, vollkommen ausreichend ist. Hervorzuheben ist die Besonderheit, dass das hier vorgestellte Kokultursystem auf die bisher als unabdingbar eingestufte T-Zellhilfe für den B-Zelldifferenzierungsprozess verzichten

kann. Die plasmazytoide dendritische Zelle scheint unter den gegebenen Bedingungen die T-Zelle in gewissen Grenzen ersetzen zu können, was für einige, bereits in der Literatur existierende, nicht gelöste Fragestellungen eine Erklärung bietet. Gleichfalls konnten wir die Förderung des Differenzierungsprozesses durch die Präsenz der plasmazytoiden dendritischen Zelle auch für die B-Gedächtniszelle nachweisen. Ein Zytokin-Blockadeversuch schaffte teilweise Klarheit über den Mechanismus: einen großen Beitrag zur der B-Zell/PDC-Interaktion trägt mit Sicherheit das unter den gegebenen Bedingungen von der plasmazytoiden dendritischen Zelle sezernierte Interferon-alpha sowie die von den B-Zellen unter den beschriebenen Voraussetzungen im vermehrten Maße produzierten Zytokine IL-6 und IL-10 (Abb. **26A**).

Der Nachweis von IgG konnte lediglich für die Überständen der Kokulturbedingungen mit B-Gedächtniszellen geführt werden. Der plasmazytoiden dendritischen Zelle scheint es im Vergleich zur T-Zelle unter den gegebenen Bedingungen an der Fähigkeit zu mangeln, einen *isotype-switch* in der naiven B-Zelle auszulösen. Die Aufnahme einer dritten Zellpopulation, der myeloiden dendritischen Zelle (MDC), in das Kokultursystem soll entscheidende Impulse für die Auslösung eines *isotype-switch* in der naiven B-Zelle geben. Das Kokultursystem von naiven B-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen müsste unter der Stimulation mit ODN M362 und anti-Ig optimale Bedingungen schaffen, die eine myeloide dendritische Zelle zur Sekretion von BLYS/APRIL und dem Zytokin IL-15 veranlasst – lösliche Faktoren, die nachweislich einen entscheidenden Einfluss auf den B-Zelldifferenzierungsprozess ausüben. Es konnten in der hier vorliegenden Dissertation Hinweise gewonnen werden, dass die angenommene „Dreiecksbeziehung“ zwischen plasmazytoider dendritischer Zelle, myeloider dendritischer Zelle und naiver B-Zelle einen Immunglobulin(Ig)-Klassenwechsel ohne Beteiligung einer T-Zelle nach sich zieht (Abb. **26B**).

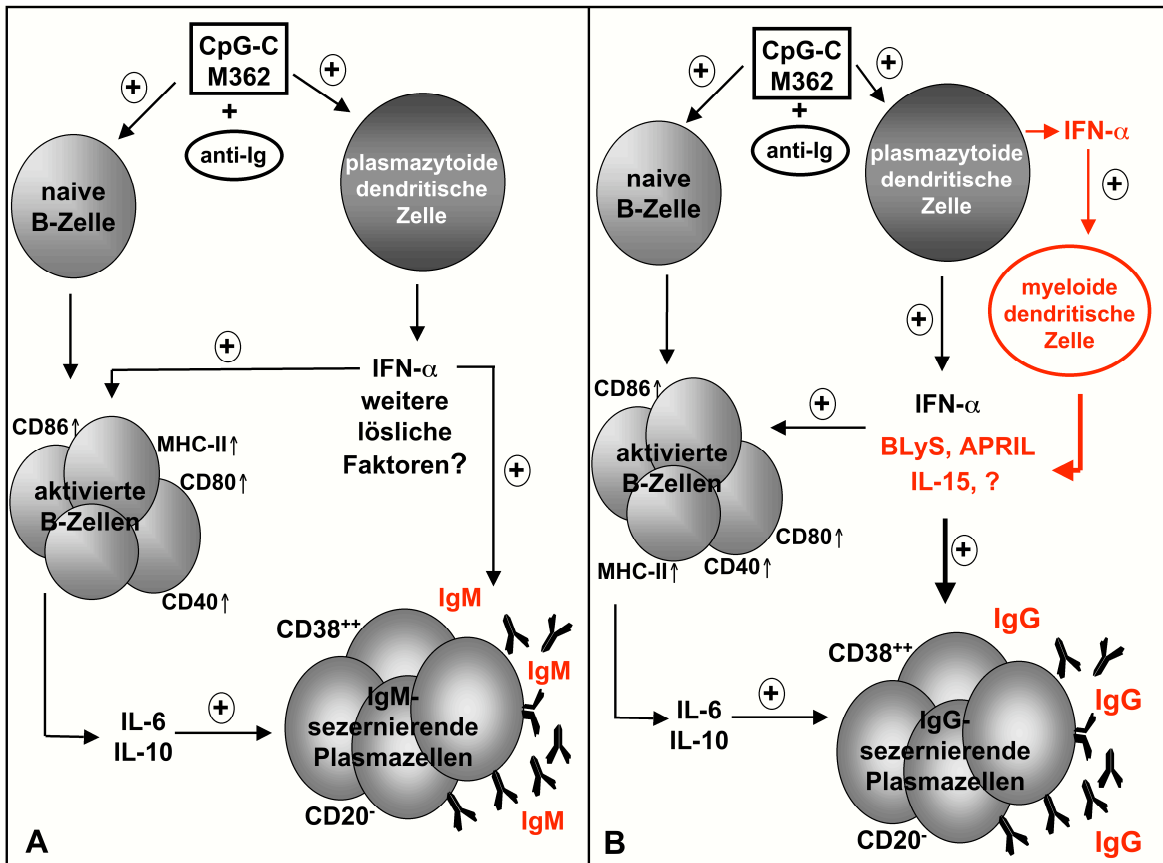


Abbildung 26 B-Zell-PDC-Interaktion schematisch dargestellt. In Abbildung A werden die in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Ergebnisse zum Einfluss der plasmazytoiden dendritischen Zelle auf den B-Zelldifferenzierungsprozess ohne Beteiligung einer T-Zelle dargestellt. Abbildung B skizziert die Idee einer Dreiecksbeziehung zwischen naiver B-Zelle, plasmazytoider dendritischer Zelle und myeloider dendritischer Zelle, die theoretisch einen Immunglobulin-Klassenwechsel in der naiven B-Zelle auslösen müsste, was allerdings noch zu bestätigen ist.

Bei der Durchführung von *in vitro*-Untersuchungen mit Gelatine-Nanopartikeln, die über elektrostatische Wechselwirkungen auf ihrer Oberfläche CpG-ODN adsorbieren können, wurde eine mögliche „Darreichungsform“ für ansonsten unter physiologischen Bedingungen instabile Nucleinsäuren entdeckt. Ein großer Vorteil des eingesetzten *drug-delivery*-Systems als künftige Applikationsform für CpG-ODN ist die Unbedenklichkeit der Ausgangssubstanz Gelatine sowie die Option, die Partikeloberfläche aufgrund der freien Seitenketten der Gelatine zu modifizieren und zur Verstärkung der Aktivierung gleichzeitig ein Antigen bzw. andere Immunstimulantien, wie siRNA, zu binden.

Die hier vorgestellten Daten mit Oligonukleotid-beladenen Gelatine-Nanopartikeln zeigten im Vergleich zu der ungebundenen Form eines Oligonukleotids ein abweichendes immunstimulatorisches Potential. Das Aktivierungsprofil eines partikulär vorliegenden Oligonukleotids verschiebt

sich hin zu einer 100%igen Stimulation der plasmazytoiden dendritischen Zelle, die sich in der Sekretion großer Mengen an Interferon-alpha manifestiert. B-Zellen sind hingegen inert gegenüber der partikulären Präsentation von CpG-ODN. Dies steht im Einklang mit der erhobenen Struktur-Wirkungsbeziehung, wie oben bereits erläutert. Den Mechanismus, der diesen Resultaten zugrunde liegt, ist nicht bekannt: vermutlich spielt die multimere Präsentation des CpG-Motivs bei der Aktivierung der Signaltransduktion, die in der Sekretion von Interferon-alpha mündet, eine bedeutende Rolle. Auf eine unterschiedliche Aufnahmerate zwischen gebundener und freier Form des CpG-ODN ist das beschriebene Phänomen mit großer Wahrscheinlichkeit nicht zurückzuführen.

Wir identifizierten in der hier vorliegenden Dissertation neue CpG-ODN-Sequenzen mit abweichendem Stimulationsprofil im Vergleich zu den Vertretern der bisher bekannten CpG-A- und B-Klassen. Zur Definition der neuen Oligonukleotid-Klasse ermittelten wir sowohl die immunstimulatorischen Eigenschaften als auch strukturelle Voraussetzungen. Neben dem Nachweis des Aktivierungsmusters für die einzelnen CpG-sensitiven Zellpopulationen dienten die neuen CpG-C-ODN zudem als Stimulationsquelle in einem Kokultursystem aus plasmazytoider dendritischer Zelle und B-Zelle, um die Einflussnahme der plasmazytoiden dendritischen Zelle auf den B-Zelldifferenzierungsprozess aufzuklären. Des Weiteren wurde ein *drug-delivery*-System für die neuen CpG-Sequenzen mit Zielsetzung eines therapeutischen Einsatzes *in vitro* untersucht und die funktionelle Konsequenz erarbeitet, die sich ergibt, sobald einem CpG-ODN ein partikulärer Charakter verliehen wird.

VI. Literatur

- [1] Janeway, CA Jr. (1989). „Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.“ Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54**:1-13
- [2] Medzhitov, R. and Janeway, C.A. Jr. (1997). „Innate immunity: impact on the adaptive immune response.“ Curr. Opin. Immunol. **9**:4-9
- [3] Stahl, P.D. and Ezekowitz, R.A. (1998). „The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense.“ Curr. Opin. Immunol. **10**:50-55
- [4] Peiser, L., Mukhopadhyay, S., et al. (2002). „Scavenger receptors in innate immunity.“ Curr. Opin. Immunol. **14**:123-128
- [5] Lemaitre, B., Nicolas, E., et al. (1996). „The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults.“ Cell **86**:973-983
- [6] Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., et al. (1997). „A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.“ Nature **388**:394-397
- [7] Poltorak, A., He X., et al. (1998). „Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutation in Tlr4 gene.“ Science **282**:2085
- [8] Matzinger, P. (1998). „An innate sense of danger.“ Semin. Immunol. **10**:399-415
- [9] Ozinsky, A., Underhill, D. M., et al. (2000). „The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors.“ Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**:13766-13771
- [10] Kaisho, T. and Akira, S. (2002). „Toll-like receptors as adjuvant receptors.“ Biochim. Biophys. Acta **1589**: 1-13
- [11] Yoshimura, A., Lien, E., et al. (1999). „Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2.“ J. Immunol. **163**: 1-5
- [12] Underhill, D. M., Ozinsky, A., et al. (1999). „The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens.“ Nature **401**: 811-815
- [13] Means, T. K., Lien, E., et al. (1999). „The CD14 ligands lipooligosaccharide and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors.“ J. Immunol. **163**: 6748-6755
- [14] Means, T. K., Wang, S., et al. (1999). „Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis.“ J. Immunol. **163**: 3920-3927
- [15] Takeuchi, O., Kaufmann, A., et al. (2000). „Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway.“ J. Immunol. **164**: 554-557
- [16] Takeuchi, O., Kawai, T., et al. (2001). „Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6.“ Int. Immunol. **13**: 933-940
- [17] Alexopoulou, L., Holt, A. C., et al. (2001). „Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.“ Nature **413**: 732-738
- [18] Qureshi, S. T., Lariviere, L., et al. (1999). „Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4).“ J. Exp. Med. **189**: 615-625
- [19] Hoshino, K., Takeuchi, O., et al. (1999). „Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product.“ J. Immunol. **162**: 3749-3752
- [20] Kurt-Jones, E. A., Popova, L., et al. (2000). „Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus.“ Nat. Immunol. **1**: 398-401
- [21] Ohashi, K., Burkart, V., et al. (2000). „Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex.“ J. Immunol. **164**: 558-561
- [22] Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., et al. (2001). „Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells.“ J. Biol. Chem. **276**: 31332-31339
- [23] Okamura, Y., Watari, M., et al. (2001). „The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4.“ J. Biol. Chem. **276**: 10229-10233
- [24] Hayashi, F., Smith, K. D., et al. (2001). „The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5.“ Nature **410**: 1099-1103

- [25] Takeuchi, O., Kawai, T., et al. (1999). „TLR6: a novel member of an expanding toll-like receptor family.“ Gene **231**: 59-65
- [26] Hornung, V., Schlender, J., et al. (2004). „Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus.“ J. Immunol. **173**: 5935-5943
- [27] Jurk, M., Heil, F., et al. (2002). „Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848.“ Nat. Immunol. **3**: 499
- [28] Hemmi, H., Takeuchi, O., et al. (2000). „A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.“ Nature **408**: 740-745
- [29] Matsumoto, M., Funami, K., et al. (2003). „Subcellular localization of toll-like receptor 3 in human dendritic cells.“ J. Immunol. **171**: 3154-3162
- [30] Heil, F., Ahmad-Nejad, P., et al. (2003). „The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily.“ Eur. J. Immunol. **33**: 2987-2997
- [31] Diebold, S. S., Kaisho, T., et al. (2004). „Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA.“ Science **303**: 1529-1531
- [32] Akira, S. and Takeda, K. (2004). „Toll-like receptor signalling.“ Nat. Rev. Immunol. **4**: 499
- [33] Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957). „Virus interference 1: the interferon.“ Proc. R. Soc. Lond. B **147**: 258-267
- [34] Katze, M. G., He, Y., et al. (2002). „Viruses and interferon: a fight for supremacy.“ Nat. Rev. Immunol. **2**: 675-687
- [35] Sheppard, P., Kindsvogel, W., et al. (2003). „IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R.“ Nat. Immunol. **4**: 63-68
- [36] Dumoutier, L., Lejeune, D., et al. (2003). „Cloning a new type II cytokine receptor activating signal transducer and activator of transcription (STAT) 1, STAT2 and STAT3.“ J. Biochem. **370**: 391-396
- [37] Kerkmann, M., Rothenfusser, S., 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**: 4465-4474
- [38] Ortaldo, J. R., Mantovani, A., et al. (1983). „Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes.“ Int. J. Cancer. **31**: 285-289
- [39] Zhang, X., Sun, S., et al. (1998). „Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells *in vivo* by IL-15.“ Immunity **8**: 591-599
- [40] Marrack, P., Kappler, J., et al. (1999). „Type I interferons keep activated T cells alive.“ J. Exp. Med. **189**: 521-530
- [41] Le Bon, A., Schiavoni, G., et al. (2001). „Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells *in vivo*.“ Immunity **14**: 461-470
- [42] Santini, S. M., Lapenta, C., et al. (2000). „Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity *in vitro* and in Hu-PBL-SCID mice.“ J. Exp. Med. **191**: 1777-1788
- [43] Sallusto, F., Schaerli, P., et al. (1998). „Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation.“ Eur. J. Immunol. **28**: 2760-2769
- [44] Medzhitov, R. (2001). „Toll-like receptors and innate immunity.“ Nat. Rev. Immunol. **1**: 135-145
- [45] Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998). „Dendritic cells and the control of immunity.“ Nature **392**: 245-252
- [46] Constant, S. L. and Bottomly, K. (1997). „Induction of Th1 and Th2 CD4+ T-cell responses: the alternative approaches.“ Annu. Rev. Immunol. **15**: 297-322
- [47] Trinchieri, G. (2003). „Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity.“ Nat. Rev. Immunol. **3**: 133-146
- [48] Young, J. W. and Steinman, R.M. (1990). „Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells.“ J. Exp. Med. **171**: 1315-1332
- [49] Takeda, K. and Akira, S. (2005). „Toll-like receptors in innate immunity.“ Int. Immunol. **17**: 1-14
- [50] Janeway, C. A. Jr. and Medzhitov, R. (1998). „Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response.“ Semin. Immunol. **10**: 349-350
- [51] O'Doherty, U., Peng, M., et al. (1994). „Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature.“ Immunology **82**: 487-493
- [52] Shortman, K. and Lui, Y. J. (2002). „Mouse and human dendritic cell subtypes.“ Nat. Rev. Immunol. **2**: 151-161
- [53] Lennert, K. and Remmele, W. (1958). „Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinalblasts, lymphoblasts and lymphocytes.“ Acta Haematol. **19**: 99-113

- [54] Feller, A.C., Lennert, K., et al. (1983). „Immunohistology and aetiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Report of three instructive cases.“ Histopathology **7**: 825-839
- [55] Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., et al. (1988). „Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin.“ Am. J. Pathol. **133**: 15-21
- [56] Grouard, G., Durand, I., et al. (1996). „Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres.“ Nature **384**:364-367
- [57] Grouard, G., Risoan, M. C., et al. (1997). „The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin-3 and CD40-ligand.“ J. Exp. Med. **185**:1101-1111
- [58] Fitzgerald-Bocarsly, P. (1993). „Human natural interferon-alpha producing cells.“ Pharmacol. Ther. **60**: 39-62
- [59] Yamaguchi, T., Handa, K., et al. (1977). „Target cells for interferon production in human leukocytes stimulated by sendai virus.“ J. Immunol. **118**: 1931-1935
- [60] Abb, J., Abb, H., et al. (1983). „Phenotype of human alpha-interferon producing leucocytes identified by monoclonal antibodies.“ Clin. Exp. Immunol. **52**:179-184
- [61] Perussia, B., Fanning, V., et al. (1985). „A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for *in vitro* alpha interferon production in response to viruses.“ Nat. Immun. Cell Growth Regul. **4**:120-137
- [62] Svensson, H., Johannisson, A., et al. (1996). „The cell surface phenotype of human natural interferon- α producing cells as determined by flow cytometry.“ Scand. J. Immunol. **44**: 164-172
- [63] Siegal, F. P., Kadowaki, N., et al. (1999). „The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood.“ Science **284**: 1835-1837
- [64] Cella, M., Jarrossay, D., et al. (1999). „Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferons.“ Nat. Med. **5**:919-923
- [65] Blom, B., Ho, S., et al. (2000). „Generation of interferon α -producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34 hematopoietic stem cells.“ J. Exp. Med. **192**: 1785-1796
- [66] Gilliet, M., Boonstra, A., et al. (2002). „The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor.“ J. Exp. Med. **195**: 953-958
- [67] Pulendran, B., Banchereau, J., et al. (2000). „Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo.“ J. Immunol. **165**: 566-572
- [68] Gretz, J. E., Norbury, C. C., et al. (2000). „Lymph-borne chemokines and other low molecular weight molecules reach high endothelial venules via specialized conduits while a functional barrier limits access to the lymphocyte microenvironments in lymph node cortex.“ J. Exp. Med. **192**: 1425-1440
- [69] Krug, A., Towarowski, A., 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**: 3026-3067
- [70] Heil, F., Hemmi, H., et al. (2004). „Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8.“ Science **303**: 1526-1529
- [71] Kadowaki, N., Ho, S., et al. (2001). „Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens.“ J. Exp. Med. **194**: 863-869
- [72] Fiebiger, E., Meraner, P., et al. (2001). „Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells.“ J. Exp. Med. **193**: 881-892
- [73] Krug, A., Veeraswamy, R., et al. (2003). „Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells.“ J. Exp. Med. **197**: 899-906
- [74] Fonteneau, J. F., Gilliet, M., et al. (2003). „Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity.“ Blood **101**: 3520-3526
- [75] Boonstra, A., Asselin-Patural, C., et al. (2003). „Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation.“ J. Exp. Med. **197**: 101-109
- [76] Kadowaki, N., Antonenko, S., et al. (2000). „Natural interferon α/β -producing cells link innate and adaptive immunity.“ J. Exp. Med. **192**: 219-226
- [77] Cella, M., Facchetti, F., et al. (2000). „Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive potent TH1 polarization.“ Nat. Immunol. **1**: 305-310
- [78] Risoan, M. C., Soumelis, V., et al. (1999). „Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation.“ Science **283**: 1183-1186

- [79] Ito, T., Amakawa, R., et al. (2001). „Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs.“ J. Immunol. **166**: 2961-2969
- [80] Colonna, M., Trinchieri, G., et al. (2004). „Plasmacytoid dendritic cells in immunity.“ Nat. Immunol. **5**: 1219-1226
- [81] Wiemann, B. and Starnes, C. O. (1994). „Coley’s toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective.“ Pharmacol. Ther. **64**: 529-564
- [82] Coley, W. B. (1991). „The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893.“ Clin. Orthop. **262**: 3-11
- [83] Morales, A., Eiding, D., et al. (2002). „Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. 1976.“ J. Urol. **167**: 891-895
- [84] Tokunaga, T., Yamamoto, H., et al. (1984). „Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterisation and antitumor activity.“ J. Natl. Cancer Inst. **72**: 955-962
- [85] Yamamoto, S., Yamamoto, T., et al. (1992). „DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth.“ Microbiol. Immunol. **36**: 983-997
- [86] Kuramoto, E., Yano, O., et al. (1992). „Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation.“ Jap. J. Cancer Res. **83**: 1128-1131
- [87] Messina, J. P., Gilkeson, G. S., et al. (1991). „Stimulation of *in vitro* murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA.“ J. Immunol. **147**: 1759-1764
- [88] Messina, J. P., Gilkeson, G. S., et al. (1993). „The influence of DNA structure on the *in vitro* stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucleotide antigens.“ Cell Immunol. **147**: 148-157
- [89] Krieg, A. M., Yi, A. K., et al. (1995). „CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation.“ Nature **374**: 546-549
- [90] Bird, A. P. (1987). „CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus.“ Trends Genet. **3**: 342-347
- [91] Han, J., Zhu, Z., et al. (1994). „Selection of antisense oligonucleotides on the basis of genomic frequency of the target sequence.“ Antisense Res. Dev. **4**: 53-65
- [92] Yi, A. K., Klinman, D. M., et al. (1996). „Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway.“ J. Immunol. **157**: 5394-5402
- [93] Redford, T. W., Yi, A. K., et al. (1998). „Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides.“ J. Immunol. **161**: 3930-3935
- [94] Davis, H. L., Weeratna, R., et al. (1998). „CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen.“ J. Immunol. **160**: 870-876
- [95] Hartmann, G. and Krieg, A. M. (2000). „Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells.“ J. Immunol. **164**: 944-953
- [96] Yi, A. K. and Krieg, A. M. (1998). „CpG DNA rescue from anti-IgM-induced WEHI-231 B lymphoma apoptosis via modulation of I κ B α and I κ B β and sustained activation of nuclear factor- κ B/c-Rel.“ J. Immunol. **160**: 1240-1245
- [97] Hornung, V., Rothenfusser, S., 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**: 4531-4537
- [98] Kadowaki, N., Ho, S., et al. (2001). „Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens.“ J. Exp. Med. **194**: 863-869
- [99] Krug, A., Towarowski, A., 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**: 3026
- [100] Krug, A., Rothenfusser, S., et al. (2001). „Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells.“ Eur. J. Immunol. **31**: 2154-2163
- [101] Shimada, S., Yano, O., et al. (1986). „*In vivo* augmentation of natural killer cell activity with a deoxyribonucleic acid fraction of BCG.“ Jap. J. Cancer Res. **77**: 808-816
- [102] Yamamoto, T., Yamamoto, S., et al. (1994). „Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes *in vitro*.“ Jap. J. Cancer Res **85**: 775-779
- [103] Ballas, Z. K., Rasmussen, W. L., et al. (1996). „Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA.“ J. Immunol. **157**: 1840-1845
- [104] Sun, S., Zhang, X., et al. (1998). „Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA.“ J. Exp. Med. **188**: 2335-2342

- [105] Zhao, Q., Waldschmidt, T., et al. (1994). „Stage-specific oligonucleotide uptake in murine bone marrow B-cell precursors.“ Blood **84**: 3660-3666
- [106] Yi, A. K., Tuetken, R., et al. (1998). „CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species.“ J. Immunol. **160**: 4755-4761
- [107] Macfarlane, D. E. and Manzel, L. (1998). „Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinqrine, chloroquine, and structurally related compounds.“ J. Immunol. **160**: 1122-1131
- [108] Hacker, H., Vabulas, R. M., 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**: 595-600
- [109] Hemmi, H., Takeuchi, O., et al. (2000). „A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.“ Nature **408**: 740-745
- [110] Bauer, S., Kirschning, C.J., et al. (2001). „Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition.“ Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**: 9237-9242
- [111] Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., et al. (2002). „Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments.“ Eur. J. Immunol. **32**: 1958-1968
- [112] Latz, E., Schoenemeyer, A., et al. (2004). „TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome.“ Nat. Immunol. **5**:190-198
- [113] Eckstein, F. (1985). „Nucleoside phosphorothioates.“ Annu. Rev. Biochem. **54**: 367-402
- [114] Gursel, M., Verthelyi, D., et al. (2002). „Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide.“ J. Leukoc. Biol. **71**: 813-820
- [115] Verthelyi, D., Ishii, K. J., et al. (2001). „Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CpG motifs.“ J. Immunol. **166**: 2372-2377
- [116] Krieg, A. M. (2002). „CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects.“ Annu. Rev. Immunol. **20**: 709-760
- [117] Kadowaki, N., Antonenko, S., et al. (2001). „Distinct CpG-DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c-type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN.“ J. Immunol. **166**: 2291-2295
- [118] Hartmann, G., Weeratna, R. D., et al. (2000). „Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses *in vitro* and *in vivo*.“ J. Immunol. **164**: 1617-1624
- [119] Rothenfusser, S., Tuma, E., et al. (2002). „Plasmacytoid dendritic cells: The key to CpG.“ Hum. Immunol. **63**: 1111-1119
- [120] Klinman, D. M., Conover, J., et al. (1999). „Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection.“ Infect. Immun. **67**: 5658-5663
- [121] Krieg, A. M., Homann, L. L., et al. (1998). „CpG DNA induces sustained IL-12 expression *in vivo* and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge.“ J. Immunol. **161**: 2428-2434
- [122] Pyles, R. B., Higgins, D., et al. (2002). „Use of immunostimulatory sequence-containing oligonucleotides as topical therapy for genital herpes simplex virus type 2 infection.“ J. Virol. **76**: 11387-11396
- [123] Ashkar, A. A., Bauer, S., et al. (2003). „Local delivery of CpG oligodeoxynucleotides induces rapid changes in the genital mucosa and inhibits replication, but not entry of herpes simplex virus type 2.“ J. Virol. **77**: 8948-8956
- [124] Zimmermann, S., Egeter, O., et al. (1998). „CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative TH1 responses in lethal murine leishmaniasis.“ J. Immunol. **160**: 3627-3630
- [125] Gramzinski, R.A., Doolan, D. L., et al. (2001). „Interleukin-12- and gamma interferon-dependent protection against malaria conferred by CpG oligodeoxynucleotide in mice.“ Infect. Immun. **69**: 1643-1649
- [126] Ishii, K. J., Ito, S., et al. (2005). „CpG-activated Thy1.2+ dendritic cells protect against lethal *Listeria monocytogenes* infection.“ Eur. J. Immunol. **35**:2397-2405
- [127] Verthelyi, D., Gursel, M., et al. (2003). „CpG oligodeoxynucleotides protect normal and SIV-infected macaques from *Leishmania* infection.“ J. Immunol. **170**: 4717-4723
- [128] Klinman, D. M., Barnhart, K. M., et al. (1999). „CpG motifs as immune adjuvants.“ Vaccine **17**: 19-25
- [129] Moldoveanu, Z., Love-Homan, L., et al. (1998). „CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus.“ Vaccine **16**: 1216-1224
- [130] McCluskie, M. J. and Davis, H. L. (1998). „CpG DNA is a potent enhancer in systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice.“ J. Immunol. **161**: 4463-4466
- [131] Eastcott, J. W., Holmberg, C. J., et al. (2001). „Oligonucleotide containing CpG motifs enhances immune response to mucosally or systemically administered tetanus toxoid.“ Vaccine **19**: 1636-1642

- [132] Davis, H. L., Suparto, I. I., et al. (2000). „CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans.“ Vaccine **18**: 1920-1924
- [133] Robinson, D. S., Hamid, Q., et al. (1992). „Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma.“ N. Engl. J. Med. **326**: 298-304
- [134] Nakajima, H., Iwamoto, I., et al. (1993). „Aerosolized recombinant Interferon- γ prevents antigen-induced eosinophil recruitment in mouse trachea.“ Am. Rev. Respir. Dis. **148**: 1102-1104
- [135] Sur, S., Lam, J., et al. (1996). „Immunomodulatory effects of IL-12 on allergic lung inflammation depend on timing of doses.“ J. Immunol. **157**: 4173-4180
- [136] Kline, J. N., Waldschmidt T. J., et al. (1998). „Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma.“ J. Immunol. **160**: 2555-2559
- [137] Sur, S., Wild, J. S., et al. (1999). „Long-term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides.“ J. Immunol. **162**: 6284-6293
- [138] Carpentier, A. F., Chen, L., et al. (1999). „Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice.“ Cancer Res. **59**: 5429-5432
- [139] Carpentier, A. F., Xie, J., et al. (2000). „Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs.“ Clin. Cancer Res. **6**: 2469-2473
- [140] Wooldridge, J. E., Ballas, Z., et al. (1997). „Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma.“ Blood **89**: 2994-2998
- [141] Brunner, C., Seiderer, J., et al. (2000). „Enhanced dendritic cell maturation by TNF- α or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation *in vitro* and therapeutic anti-tumor immune responses *in vivo*.“ J. Immunol. **165**: 6278-6286
- [142] Heckelsmiller, K., Beck, S., et al. (2002). „Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy.“ Eur. J. Immunol. **32**: 3235-3245
- [143] Heckelsmiller, K., Rall, K., et al. (2002). „Peritumoral CpG-DNA elicits a coordinated response to CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model.“ J. Immunol. **169**: 3892-3899
- [144] Gilkeson, G. S., Pippen, A. M., et al. (1995). „Induction of cross-reactive anti-dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA.“ J. Clin. Invest. **95**: 1398-1402
- [145] Krieg, A. M. (1995). „CpG DNA, a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus?“ J. Clin. Immunol. **15**: 284-292
- [146] Katsumi, A., Emi, N., et al. (1994). „Humoral and cellular immunity to an encoded protein induced by direct DNA injection.“ Hum. Gene Ther. **5**: 1335-1339
- [147] Klinman, D. M., Takeno, M., et al. (1997). „DNA vaccines, safety and efficacy issues.“ Springer Semin. Immunopathol. **19**: 245-256
- [148] Halperin, S. A., Van Nest, G., et al. (2003). „A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant.“ Vaccine **21**: 2461-2467
- [149] Cooper, C. L., Davis, H. L., et al. (2004). „Safety and immunogenicity of CpG 7909 as an adjuvant to Fluarix influenza vaccine.“ Vaccine **22**: 3136-3146
- [150] Klinman, D. M. (2003). „CpG DNA as a vaccine adjuvant.“ Expert Rev. Vaccines **2**: 305-315
- [151] Banchereau, J. and Rousset, F. (1992). „Human B lymphocytes: phenotype, proliferation and differentiation.“ Adv. Immunol. **52**: 125-262
- [152] Duchosal, M. A. (1997). „B-cell development and differentiation.“ Semin. Hematol. **3**: 2-12
- [153] Cornall, R. J., Goodnow, C. C., et al. (1995). „The regulation of self-reactive B-cells.“ Curr. Opin. Immunol. **7**: 804-811
- [154] Osmond, D. G., Rolink, A., et al. (1998). „Murine B lymphopoiesis: towards a unified model.“ Immunol. Today **19**: 65-68
- [155] Lanzavecchia, A. (1990). „Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes.“ Annu. Rev. Immun. **8**: 773-793
- [156] Liu, Y. J., Johnson, G. D., et al. (1992). „Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses.“ Immunol. Today **13**: 17-21
- [157] Noelle, R. J., Ledbetter, J. A., et al. (1992). „CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation.“ Immunol. Today **13**: 431-433

- [158] Dubois, B., Massacrier, C., et al. (1998). „Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes.“ J. Immunol. **161**: 2223-2231
- [159] Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998). „Dendritic cells and the control of immunity.“ Nature **392**: 245-252
- [160] Garside, P., Ingulli, E., et al. (1998). „Visualization of specific B and T lymphocytes interactions in the lymph node.“ Science **281**: 96-99
- [161] MacLennan, I. C. M. (1994). „Germinal centers.“ Annu. Rev. Immunol. **12**: 117-139
- [162] Liu, Y.J., Zhang, J., et al. (1991). „Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens.“ Eur. J. Immunol. **21**: 2951-2962
- [163] Maizels, N. (2005). „Immunoglobulin gene diversification.“ Annu. Rev. Genet. **39**: 23-46
- [164] Liu, Y. J., Joshua, D. E., et al. (1989). „Mechanism of antigen driven selection in germinal centers.“ Nature **342**:929-931
- [165] Stavnezer, J. (1996). „Immunoglobulin class switching.“ Curr. Opin. Immunol. **8**: 199-205
- [166] Besmer, E., Gourzi, P., et al. (2004). „The regulation of somatic hypermutation.“ Curr. Opin. Immunol. **16**: 241-245
- [167] Slifka, M. K., Antia, R., et al. (1998). „Humoral immunity due to long-lived plasma cells.“ Immunity **8**: 363-372
- [168] Kawano, M. M., Mihara, K., et al. (1995). „Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis.“ Blood **85**: 487-494
- [169] Sanderson, R. D., Lalor, P., et al. (1989). „B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation.“ Cell. Reg. **1**: 27-35
- [170] Deaglio, S., Mehta, K., et al. (2001). „Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors.“ Leuk. Res. **25**: 1-12
- [171] Hargreaves, D. C., Hyman, P. L., et al. (2001). „A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements.“ J. Exp. Med. **194**: 45-56
- [172] Maruyama, M., Lam, K. P., et al. (2000). „Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen.“ Nature **407**: 636-642
- [173] McHeyzer-Williams, M. G. and Ahmed, R. (1999). „B cell memory and the long-lived plasma cell.“ Curr. Opin. Immunol. **11**: 172-179
- [174] Smith, K. G., Light, A., et al. (1997). „The extent of affinity differs between the memory and antibody-forming cellcompartments in the primary immune response.“ EMBO J. **16**: 2996-3006
- [175] Stuber, E. and Strober, W. (1996). „The T cell-B cell interaction via OX40-OX40L is necessary for the T cell-dependent humoral immune response.“ J. Exp. Med. **183**: 979-989
- [176] Choe, J. and Choi, Y. S. (1998). „IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells.“ Eur. J. Immunol. **28**: 508-515
- [177] Langer, R. (1998). „Drug delivery and targeting.“ Nature **392**: 5-10
- [178] Kreuter, J. (1983). „Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems I: preparation methods.“ Pharmaceutica Acta Helvetiae **58**: 196-209
- [179] Allemann, E., Gurny, R., et al. (1993). „Drug-loaded nanoparticles. Preparation methods and drug targeting issues.“ Eur. J. Pharmac. Biopharmac. **39**: 173-191
- [180] Birrenbach, G. and Speiser, P. P. (1976). „Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology.“ J. Pharm. Sci. **65**: 1763-1766
- [181] Marty, J. J., Oppenheim, R. C., et al. (1978). „Nanoparticles – a new colloidal drug delivery system.“ Pharmaceutica Acta Helvetiae **53**: 17-23
- [182] Speiser, P. (1997). Nanopartikel. In Muller RH, Hildebrand G (Eds.), Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 247-264
- [183] Arakawa, M. and Kondo, T. (1980). „Preparation and properties of poly (N alpha, N epsilon-L-lysinediylterphthaloyl) microcapsules containing hemolysate in nanometer range.“ Can. J. Physiol. Pharmacol. **58**: 183-187
- [184] Lenaerts, V., Nagelkerke, J. F., et al. (1984). „*In vivo* uptake of polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles by rat liver Kupffer, endothelial and parenchymal cells.“ J. Pharm. Sci. **73**: 980-982

- [185] Kreuter, J. (1983). „Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. II: comparison of the body distribution of nanoparticles with the body distribution of microspheres (diameter greater than 1 micron), liposomes, and emulsions.“ *Pharmaceutica Acta Helvetiae* **58**: 217-226
- [186] Chiannilkulchai, N., Driouich, Z., et al. (1989). „Doxorubicin-loaded nanoparticles: increased efficiency in murine hepatic metastases.“ *Sel. Cancer Ther.* **5**: 1-11
- [187] Illum, L., Thomas, N. W., et al. (1986). „Effect of selected suppression of the reticuloendothelial system on the distribution of model carrier particles.“ *J. Pharm. Sci.* **75**: 16-22
- [188] Peracchia, M. T., Fattal, E., et al. (1999). „Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting.“ *J. Controlled Release* **60**: 121-128
- [189] Bauer, K. H., Frömming, K. H. and Führer, C. (1999). Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie, *Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft Stuttgart mbH, Stuttgart*, Seite 172 folgende
- [190] Schwick, H. G. and Heide, K. (1969). „Immunochemistry and immunology of collagen and gelatine.“ *Bibliotheca Haematologica (Basel)* **33**: 111-125
- [191] Coester, C.J., Langer, K., et al. (2000). „Gelatin nanoparticles by two step desolvation – a new preparation method, surface modifications and cell uptake.“ *J. Microencapsulation* **17**: 187-193
- [192] Farrugia, C. A. and Groves, M. J. (1999). „Gelatin behaviour in dilute aqueous solution: designing a nanoparticulate formulation.“ *J. Pharm. Pharmacol.* **51**: 643-649
- [193] Coester, C. (2003). „Development of a new carrier system for oligonucleotides and plasmids based on gelatin nanoparticles.“ *New drugs* **1**: 14-17
- [194] Zwiorek, K. and Coester, C. (2003). „Evaluation of surface-modified gelatin nanoparticles as delivery system for oligonucleotides and plasmids.“ *Poster AAPS Annual Meeting and Exposition, october 26-30, Salt Lake City, Utah, USA*
- [195] Zwiorek, K., Klöckner, J., et al. (2004). „Gelatin nanoparticles as a new and simple gene delivery system.“ *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **7**: 22-28
- [196] Brigger, I., Dubernet, C., et al. (2002). „Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis.“ *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**: 631-651
- [197] Litinskiy, M. B., Nardelli, B., et al. (2002). „DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL.“ *Nat. Immunol.* **3**: 822-829
- [198] Gibson, S. J., Lindh, J. M., et al. (2002). „Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod.“ *Cell. Immunol.* **218**: 74-86
- [199] Bekeredjian-Ding, I. B., Wagner, M., et al. (2005). „Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN.“ *J. Immunol.* **174**: 4043-4050
- [200] Jurk, M., Schulte, B., et al. (2004). „C-Class CpG ODN: sequence requirements and characterization of immunostimulatory activities on mRNA level.“ *Immunobiology* **209**: 141-154
- [201] Fearon, K., Marshall, J. D., et al. (2003). „A minimal human immunostimulatory CpG motif that potently induces IFN- γ and IFN- α production.“ *Eur. J. Immunol.* **33**: 2114-2122
- [202] Yu, D., Kandimalla, E. R., et al. (2001). „Immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides containing nonionic methylphosphonate linkages.“ *Bioorg. Med. Chem.* **9**: 2803-2808
- [203] Kandimilla, E. R., Yu, D., et al. (2001). „Effect of chemical modifications of cytosine and guanine in a CpG-motif of oligonucleotides: structure-immunostimulatory activity relationships.“ *Bioorg. Med. Chem.* **9**: 807-813
- [204] Kandimilla, E. R., Bhagat, L., et al. (2002). „Conjugation of ligands at the 5'- end of CpG DNA affects immunostimulatory activity.“ *Bioconjug. Chem.* **13**: 966-974
- [205] Yu, D., Kandimalla, E.R., et al. (2002). „Immunothers“ – novel 3'- 3'-linked CpG oligodeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents.“ *Nucleic Acids Res.* **30**: 4460-4469
- [206] Kerkmann, M., Costa, T. L., et al. (2005). „Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon- α induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells.“ *J. Biol. Chem.* **280**: 8086-8093
- [207] Narayanan, S., Dalpke, A. H., et al. (2003). „CpG oligonucleotides with modified termini and nicked dumbbell structure show enhanced immunostimulatory activity.“ *J. Med. Chem.* **46**: 5031-5044
- [208] Yu, D., Zhao, Q., et al. (2000). „Accessible 5'-end of CpG-containing phosphorothioate oligodeoxynucleotides is essential for immunostimulatory activity.“ *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**: 2585-2588
- [209] Yu, D., Zhu, F. G., et al. (2002). „Potent CpG oligonucleotides containing phosphodiester linkages: in vitro and in vivo immunostimulatory properties.“ *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**: 83-90

- [210] Pandolfi, D., Rauzi, F., et al. (1999). „Evaluation of different types of end-capping modifications on the stability of oligonucleotides toward 3'- and 5'-exonucleases.“ *Nucl. Nucl.* **18**: 2051-2069
- [211] Williamson, J. R., Raghuraman, M. K., et al. (1989). „Monovalent cation-induced dtructure of telomeric DNA: the G-quartet model.“ *Cell* **59**: 871-880
- [212] Sen, D. and Gilbert, W. (1988). „Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis.“ *Nature* **334**: 364-366
- [213] Farman, C. A. and Kornbrust, D. J. (2003). „Oligodeoxynucleotide studies in primates: antisense and immune stimulatory indications.“ *Toxicol. Pathol.* (31 suppl.) 119-122
- [214] Pisetsky, D. S. and Reich, C. F. (1994). „Stimulation of murine lymphocyte proliferation by a phosphorothioate oligonucleotide with antisense activity for herpes simplex virus.“ *Life Sci.* **54**: 101-107
- [215] Marshall, J. D., Fearon, K., et al. (2003). „Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions.“ *J. Leukoc. Biol.* **73**: 781-792
- [216] Vollmer, J., Weeratna, R., et al. (2004). „Characterization of three CpG oligonucleotide classes with distinct immunostimulatory activities.“ *Eur. J. Immunol.* **34**: 251-262
- [217] Marshall, J. D., Fearon, K. L., et al. (2005). „Superior activity of the type C class of ISS in vitro and in vivo across multiple species.“ *DNA Cell Biol.* **24**: 63-72
- [218] Cong, Y. P., Song, S. S., et al. (2003). „Self-stabilized CpG DNAs optimally activate human B cells and plasmacytoid dendritic cells.“ *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**: 1133-1139
- [219] Jonasch, E. and Haluska, F. G. (2001). „Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities.“ *Oncologist* **6**: 34-55
- [220] Blazar, B. R., Krieg, A. M., et al. (2001). „Synthetic unmethylated cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotides are potent stimulators of antileukemia responses in naive and bone marrow transplan recipients.“ *Blood* **98**: 1217-1225
- [221] Burdin, N., Van Kooten, C., et al. (1994). „Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated humna B lymphocytes.“ *J. Immunol.* **154**: 2533-2544
- [222] Taga, T., Kawanishi, Y., et al. (1987). „Receptors of B cell stimulatory factor.“ *J. Exp. Med.* **166**: 967-981
- [223] Payvandi, F., Amrute, S., 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**: 5861-5868
- [224] Bauer, M., Redecke, V., et al. (2001). „Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human Cd11c-, CD123+ dendritic cells.“ *J. Immunol.* **166**: 5000-5007
- [225] Duramad, O., Fearon, K. L., et al. (2003). „IL-10 regulate plasmacytoid dendritic cell response to CpG-containing immunstimulatory sequences.“ *Blood* **102**: 4487-4492
- [226] Rousset, F., Garcia, E., et al. (1992). „Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1890-1893
- [227] Choe, J. and Choi, Y. S. (1998). „IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells.“ *Eur. J. Immunol.* **28**: 508-515
- [228] Gantner, F., Hermann, P., et al. (2003). „CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides.“ *Eur. J. Immunol.* **33**: 1576-1585
- [229] Jung, J., Yi, A. K., et al. (2002). „Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA.“ *J. Immunol.* **169**: 2368-2373
- [230] Bernasconi, N. L., Traggiai, E., et al. (2002). „Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells.“ *Science* **298**: 2199-2202
- [231] Hayakawa, K., Hardy, R. R., et al. (1983). „The „Ly-1 B“ cell subpopulation in normal immunodefective, and autoimmune mice.“ *J. Exp. Med.* **157**: 202-218
- [232] Mond, J. J., Vos, Q., et al. (1995). „T cell independent antigens.“ *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 349-354
- [233] Fagarasan, S. and Honjo, T. (2000). „T-independent immune response: new aspects of B cell biology.“ *Science* **290**: 89-92
- [234] Bategay, M., Bachmann, M. F., et al. (1996). „Antiviral immune responses of mice lacking MHC class II or its associated invariant chain.“ *Cell. Immunol.* **167**: 115-121
- [235] Mach, F., Schonbeck, U., et al. (1997). „Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 1931-1936

- [236] Gauchat, J. F., Henchoz, S., et al. (1993). „Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils.“ Nature **365**: 340-343
- [237] Henn, V., Slupsky, J. R., et al. (1998). „CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells.“ Nature **391**: 591-594
- [238] Pinchuk, L. M., Klaus, S. J., et al. (1996). „Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is upregulated by CD40 ligation.“ J. Immunol. **157**: 4363-4370
- [239] Grammer, A. C., Bergman, M. C., et al. (1995). „The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses.“ J. Immunol. **154**: 4996-5010
- [240] Morikawa, K., Kubagawa, H., et al. (1987). „Recombinant interferon-alpha, -beta, and -gamma enhance the proliferative response of human B cells.“ J. Immunol. **139**: 761-766
- [241] Kumanogoh, A., Marukawa, S., et al. (1997). „Impairment of antigen-specific antibody production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of gp130.“ Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 2478-2482
- [242] MacLennan, I. und Vinuesa, C. (2002). „Dendritic cells, BAFF, and APRIL. Innate players in adaptive antibody responses.“ Immunity **17**: 235-238
- [243] Jego, G., Palucka, A. K., et al. (2003). „Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin-6.“ Immunity **19**: 225-234
- [244] Fayette, J., Durand, I., et al. (1998). „Dendritic cells enhance the differentiation of naive B cells into plasma cells *in vitro*.“ Scand. J. Immunol. **48**: 563-570
- [245] Chester, T. J., Pauker, K., et al. (1973). „Suppression of mouse antibody producing spleen cells by various interferon preparations.“ Nature **246**: 92-94
- [246] Brodeur, B. R. and Merigan, T. C. (1974). „Suppressive effect of interferon on the humoral immune response to sheep red blood cells in mice.“ J. Immunol. **113**: 1319-1325
- [247] Strannegard, O., Larsson, I., et al. (1978). „Modulation of immune responses in newborn and adult mice by interferon.“ Infect. Immun. **20**: 334-339
- [248] Vignaux, F., Gresser, I., et al. (1980). „Effect of virus-induced interferon on the antibody response of suckling and adult mice.“ Eur. J. Immunol. **10**: 767-772
- [249] Neubauer, R. H., Goldstein, L., et al. (1985). „Stimulation of *in vitro* immunoglobulin production by interferon-alpha.“ J. Immunol. **134**: 299-304
- [250] Peters, M., Ambrus, J. L., et al. (1986). „Effect of interferon-alpha on immunoglobulin synthesis by human B cells.“ J. Immunol. **137**: 3153-3157
- [251] Inaba, K., Steinman, R. M., et al. (1983). „Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and man.“ Proc Natl Acad Sci USA **80**: 6041-6045
- [252] Sornasse, T., Flamand, V., et al. (1992). „Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response *in vivo*.“ J. Exp. Med. **175**: 15-21
- [253] Wykes, M., Pombo, A., et al. (1998). „Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response.“ J. Immunol. **161**: 1313-1319
- [254] Fayette, J., Dubois, B., et al. (1997). „Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2.“ J. Exp. Med. **185**: 1909-1918
- [255] Poeck, H., Wagner, M., et al. (2004). „Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help.“ Blood **103**: 3058-3064
- [256] Bernasconi, N. L., Onai, N., et al. (2003). „A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells.“ Blood **101**: 4500-4504
- [257] Durandy, A. and Honjo, T. (2001). „Human genetic defects in class-switch recombination (hyper-IgM syndromes).“ Curr. Opin. Immunol. **13**: 543-548
- [258] Moore, P. A., Belvedere, O., et al. (1999). „BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator.“ Science **285**: 260-263
- [259] Schneider, P., MacKay, F., et al. (1999). „BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth.“ J. Exp. Med. **189**: 1747-1756
- [260] Yan, M., Marsters, S. A., et al. (2000). „Identification of a receptor for BLyS demonstrates a crucial role in humoral immunity.“ Nat. Immunol. **1**: 37-41
- [261] Hahne, M., Kataoka, T., et al. (1998). „APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth.“ J. Exp. Med. **188**: 1185-1190

- [262] Do, R. K., Hatada, E., et al. (2000). „Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response.“ J. Exp. Med. **192**: 953-964
- [263] Schiemann, B., Gommerman J. L., et al. (2001). „An essential role of BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway.“ Science **293**: 2111-2114
- [264] Szomolanyi-Tsuda, E., Le, Q. P., et al. (1998). „T-cell-independent immunoglobulin G responses *in vivo* elicited by live-virus infection but not by immunization with viral proteins or vitus-like particles.“ J. Virol. **72**: 6665-6670
- [265] Xu, J., Foy, T. M., et al. (1994). „Mice deficient for the CD40 ligand.“ Immunity **1**: 423-431
- [266] Renshaw, B. R., Fanslow, W. C. 3rd, et al. (1994). „Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice.“ J. Exp. Med. **180**: 1889-1900
- [267] Blanco, P., Palucka, A. K., et al. (2001). „Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus.“ Science **294**: 1540-1543
- [268] Moore, P. A., Belvedere, O., et al. (1999). „BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator.“ Science **285**: 260-263
- [269] Mackay, F., Woodcock, S. A., et al. (1999). „Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations.“ J. Exp. Med. **190**: 1697-1710
- [270] Nardelli, B., Belvedere, O., et al. (2001). „Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells.“ Blood **97**: 198-204
- [271] Armitage, R. J., Macduff, B. M., et al. (1993). „Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines.“ J. Immunol. **150**: 3671-3680
- [272] Grabstein, K. H., Maliszewski, C. R., et al. (1993). „The regulation of T-cell dependent antibody formation in vitro by CD40 ligand and IL-2.“ J. Immunol. **150**: 3141-3147
- [273] Cocks, B. G., de Waal Malefyt, R., et al. (1993). „IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand.“ Int. Immunol. **5**: 657-663
- [274] Armitage, R. J., Macduff, B. M., et al. (1995). „IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation.“ J. Immunol. **154**: 483-490
- [275] Zhang, X., Sun, S., et al. (1998). „Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15.“ Immunity **8**: 591-599
- [276] Santini, S. M., Lapenta, C., et al. (2000). „Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice.“ J. Exp. Med. **191**: 1777-1788
- [277] Mattei, F., Schiavoni, G., et al. (2001). „IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation.“ J. Immunol. **167**: 1179-1187
- [278] Bishop, G. A., Hsing, Y., et al. (2000). „Molecular mechanisms of B lymphocyte activation by the immune response modifier R-848.“ J. Immunol. **165**: 5552-5557
- [279] Tomai, M. A., Imbertson, L. M., et al. (2000). „The immune response modifiers imiquimod and R-848 are potent activators of B lymphocytes.“ Cell. Immunol. **203**: 55-65
- [280] Marrack, P., Kappler, J., et al. (2001). „Autoimmune disease: why and where it occurs.“ Nat. Med. **7**: 899-905
- [281] Shlomchik, M. J., Craft, J. E., et al. (2001). „From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease.“ Nat. Rev. Immunol. **1**: 147-153
- [282] Hooks, J. J., Moutsopoulos, H. M., et al. (1979). „Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease.“ N. Engl. J. Med. **301**: 5-8
- [283] Ronnblom, L. E., Alm, G. V., et al. (1991). „Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid tumors.“ Ann. Intern. Med. **115**: 178-183
- [284] Vallin, H., Blomberg, S., et al. (1999). „Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN-alpha) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells.“ Clin. Exp. Immunol. **115**: 196-202
- [285] Braun, D., Gerald, P., et al. (2003). „Type I interferon controls the onset and severity of autoimmune manifestations in lpr mice.“ J. Autoimmun. **20**: 15-25
- [286] Santiago-Raber, M. L., Baccala, R., et al. (2003). „Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice.“ J. Exp. Med. **197**: 777-788
- [287] Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., et al. (2002). „Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors.“ Nature **416**: 603-607

- [288] Wardemann, H., Yurasov, S., et al. (2003). „Predominant autoantibody production by early human B cell precursors.“ *Science* **301**: 1374-1377
- [289] Galibert, L., Burdin, N., et al. (1996). „CD40 and B cell antigen receptor dual triggering of resting B lymphocytes turns on a partial germinal center phenotype.“ *J. Exp. Med.* **183**: 77-85
- [290] Costa, L. T., Kerkmann, M., et al. (2004). „Structural studies of oligonucleotides containing G-quadruplex motifs using AFM.“ *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**: 1065-1072
- [291] Somehara, K., Saito, H., et al. (1996). „Hexamer palindromic oligonucleotides with 5'-CG-3' motif(s) induce production of interferon.“ *J. Interferon Cytokine Res.* **16**: 799-803
- [292] Marshall, J. D., Higgins, D., et al. (2004). „Polymyxin B enhances ISS-mediated immune responses across multiple species.“ *Cell. Immunol.* **229**: 93-105
- [293] Manzel, L. and Macfarlane, D. E. (1999). „Lack of immune stimulation by immobilized CpG-oligodeoxynucleotide.“ *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **9**: 459-464
- [294] Monks, C. R. F., Freiberg, B. A., et al. (1998). „Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells.“ *Nature* **395**: 82-86
- [295] Pralle, A., Keller, P., et al. (2000). „Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells.“ *J. Cell Biol.* **148**: 997-1007
- [296] Vereb, G., Matko, J., et al. (2000). „Cholesterol-dependent clustering of IL-2R α and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 6013-6018
- [297] Marshall, J. D., Hessel, E. M., et al. (2003). „Novel chimeric immunomodulatory compounds containing short CpG oligodeoxyribonucleotides have differential activities in human cells.“ *Nucleic Acids Res.* **31**: 5122-5133
- [298] Visintin, A., Latz, E., Monks BG, Espevik T and Golenbock DT (2003). „*J. Biol. Chem.* **278**: 48313-48320
- [299] Guo, C., Dower, S. K., et al. (1995). „Fluorescence resonance energy transfer reveals Interleukin (IL)-1-dependent aggregation of IL-1 type 1 receptors that correlates with receptor activation.“ *J. Biol. Chem.* **270**: 27562-27568
- [300] Wu, C. C. N., Lee, J., et al. (2004). „Necessity of oligonucleotide aggregation for Toll-like receptor 9 activation.“ *J. Biol. Chem.* **279**: 33071-33078
- [301] Gursel, I., Gursel, M., et al. (2001). „Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides.“ *J. Immunol.* **167**: 3324-3328
- [302] Dalpke, A. H., Zimmermann, S., et al. (2002). „Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo.“ *Immunology* **106**: 102-112
- [303] Lee, S. W., Song, M. K., et al. (2000). „Effects of hexameric deoxyriboguanosine run conjugation into CpG oligodeoxynucleotides on their immunostimulatory potentials.“ *J. Immunol.* **165**: 3631-3639
- [304] Farman, C. A. and Kombrust, D. J. (2003). „Oligodeoxynucleotide studies in primates: antisense and immune stimulatory indications.“ *Toxicol. Pathol.* **31**: 932-943
- [305] Moghimi, S. M., Hunter, A. C., et al. (2001). „Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory and practice.“ *Pharmacol. Rev.* **53**: 283-318
- [306] Lambert, G., Fattal, E., et al. (2001). „Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides.“ *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**: 99-112
- [307] Evans, M. E., Feola, D. J., et al. (1999). „Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria.“ *Ann. Pharmacother.* **33**: 960-967
- [308] Chu, R. S., Targoni, O. S., et al. (1997). „CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity.“ *J. Exp. Med.* **186**: 1623-1631
- [309] Diwan, M., Tafaghodi, M., et al. (2002). „Enhancement of immune responses by co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres.“ *J. Controlled Release* **85**: 247-262
- [310] Li, W. M., Bally, M. B., et al. (2001). „Enhanced immune response to T-independent antigen by using CpG oligodeoxynucleotides encapsulated in liposomes.“ *Vaccine* **20**: 148-157
- [311] Hunter, S. K., Andracki, M. E., et al. (2001). „Biodegradable microspheres containing group B Streptococcus vaccine: immune response in mice.“ *Am. J. Obstet. Gynecol.* **185**: 1174-1179
- [312] Suzuki, Y., Wakita, D., et al. (2004). „Liposome-encapsulated CpG oligodeoxynucleotides as a potent adjuvant for inducing type 1 innate immunity.“ *Cancer Res.* **64**: 8754-8760

- [313] Singh, M., Ott, G., et al. (2001). „Cationic microparticles are an effective delivery system for immune stimulatory CpG DNA.“ Pharm. Res. **18**: 1476-1479
- [314] Hedley, M. L., Curley, J., et al. (1998). „Microspheres containing plasmid-encoded antigens elicit cytotoxic T-cell responses.“ Nat. Med. **4**: 365-368
- [315] Balthasar, S., Michaelis, K., et al. (2005). „Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes.“ Biomaterials **26**: 2723-2732
- [316] Hornung, V., Guenther-Biller, M., et al. (2005). „Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7.“ Nat. Med. **11**: 263-270

VII. Anhang

VII.1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
Ag	Antigen
AID	<i>activation-induced deaminase</i>
APC	1. antigenpräsentierende Zelle; 2. Allophycocyanin
APRIL	<i>a proliferation-inducing ligand</i>
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
BCR	<i>B cell receptor</i>
B 7.1/B 7.2	kostimulatorische Moleküle (CD80 bzw. CD86)
BDCA	<i>blood dendritic cell antigen</i>
BLyS	<i>B lymphocyte stimulator protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSF-2	<i>B cell stimulatory factor 2</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand-transfizierte Fibroblastenzelllinie
CFA	<i>complete Freund's adjuvant</i>
CIC	<i>chimeric immunomodulatory compounds</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin
CpG-DNA	CpG-haltige DNA
CpG-ODN	CpG-haltige Oligodesoxynukleotide
CSR	<i>class switch recombination</i>
CTL	zytotoxische CD8 ⁺ T-Zellen
DC	dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagles medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum
FDC	follikuläre dendritische Zelle
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Flt3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>

GC	<i>germinal center</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
HBsAg	Hepatitis B-Oberflächenantigen
HBV	Hepatitis B-Virus
HEV	<i>high endothelial venule</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HSP	Hitzeschock-Protein
HSV	Herpes-simplex-Virus
I.E.	internationale Einheit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILT3	<i>immunoglobulin-like transcript receptor 3</i>
IPC	Interferon- α -produzierende Zelle
LAL	<i>Limulus ameobocyte lysate</i>
LAM	Lipoarabinomannan
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	monoklonaler Antikörper
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
MALP-2	Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid 2kDa
MDC	myeloide dendritische Zelle
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC-I/ MHC-II	<i>major histocompatibility complex I/II</i>
MPS	mononukleär phagozytierendes System
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
ODN	Oligodesoxynukleotide
<i>p</i>	statistische Wahrscheinlichkeitskonstante
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythin
PEG	Polyethylenglykol
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-a-Protein
PolyG	Poly-Guanosin
Poly(I:C)	<i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

RES	retikulo-endotheliales System
SEM	<i>standard error of mean</i>
sgp80	<i>soluble IL-6 receptor</i>
SLE	systemischer Lupus erythematodes
ss RNA	<i>single-stranded RNA</i>
TACI	<i>transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH	T-Helfer
TI	<i>thymus-independent</i>
TIR	<i>Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne</i>
TIRAP	<i>TIR domain-containing adapter protein</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF 6	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter inducing IFN-beta</i>
V(D)J	<i>variability; diversity; joining</i>
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
W/O	Wasser-in-Öl

VII.2. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Endres für die Aufnahme in seine außergewöhnlich ambitionierte und kollegiale Arbeitsgruppe bedanken. Seiner stets vorhandenen Hilfsbereitschaft und seinem großen Engagement für jeden einzelnen Doktoranden schenke ich volle Bewunderung.

Für die kontinuierliche Betreuung und die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft möchte ich mich insbesondere bei Prof. Dr. Gunther Hartmann bedanken, der mich durch seine positive Einstellung, seine hilfreichen Anregungen sowie seine Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten stets motivieren konnte. Ich danke Dr. Anja Marschner für die ausführliche methodische Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten. Für die außerordentlich große Hilfsbereitschaft - keine Frage blieb unbeantwortet, kein Problem war unlösbar - möchte ich Dr. Simon Rothenfußer danken.

Frau Rosemarie Kiefl danke ich für die Einführung in experimentelle Techniken und ihre unermüdlige Unterstützung im Labor. Vor allen Dingen bei Hendrik Poeck und Moritz Wagner möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit beim gemeinsamen B-Zell-Projekt bedanken. Bei allen anderen Doktoranden der Abteilung, insbesondere bei Margit Günthner-Biller, Miren Kerkmann, Veit Hornung, Daniela Wellisch, Julia Söllner, Philipp Schneider und Sebastian Beck möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und die stets vorhandene Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken. Daniel Käsmayr danke ich insbesondere für seine große Hilfestellung bei der Formatierung dieser Arbeit und bei sonstigen größeren oder kleineren Computerproblemen.

Ich bedanke mich bei meinem Kooperationspartner Klaus Zwiorek (Institut für Pharmazeutische Technologie, LMU, München), der mir die Gelatine-Nanopartikel zur Verfügung stellte.

Schließlich möchte ich meinen Eltern, Erika und Karl Battiany, die mir mein Studium und meine Promotion ermöglicht haben, sehr herzlich für ihre liebevolle Unterstützung danken.

VII.3. Veröffentlichungen

Originalarbeiten

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

2. Hartmann G., **Battiany J.**, Poeck H., Wagner M., Kerkmann M., Lubenow N., Rothenfusser S. and Endres S. (2003). „Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells.“ European Journal of Immunology **33**: 1633-1641.

3. Poeck H., Wagner M., **Battiany J.** (contributed equally), Rothenfusser S., Wellisch D., Hornung V., Jahrsdorfer B., Giese T., Endres S. and Hartmann G. (2004). „Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in absence of T-cell help.“ Blood **103**: 3058-3064

4. Kerkmann M., Costa L. T., Richter C., Rothenfusser S., **Battiany J.**, Hornung V., Johnson J., Englert S., Ketterer T., Heckl W., Thalhammer S., Endres S. and Hartmann G. (2005). „Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells.“ Journal of Biological Chemistry **280**:8086-8093

Abstract und Poster

„Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells.“ Gunther Hartmann, Julia Battiany, Hendrik Poeck, Moritz Wagner, Miren Kerkmann, Norbert Lubenow, Simon Rothenfusser and Stefan Endres; *FASEB*, 2003 April; 17(7): abstract 32.8

VII.4. Lebenslauf

Name	Julia Barbara Battiany
Geburt	10. April 1976 in München
Nationalität	deutsch
1982-1986	Grundschule Gröbenzell
1986-1988	Gymnasium Gröbenzell
1988-1995	Elsa-Brändström-Gymnasium, München-Pasing
1995-1996	Lehranstalt für pharmazeutisch-technische Assistenten, München
1996-2000	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	1998 1. Staatsexamen
	2000 2. Staatsexamen
	2000-2001 Praktisches Jahr
	1. Halbjahr: Johannes-Apotheke, München
	2. Halbjahr: Klinge Pharma, München
	2001 3. Staatsexamen (Gesamtnote: gut)
	Approbation als Apothekerin
01/2002-06/2004	Doktorarbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie (Leiter: Prof. Dr. Stefan Endres), Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe " <i>Immunstimulatorische CpG-Oligonukleotide</i> " von Prof. Dr. Gunther Hartmann
seit 07/2004	Apothekerin in der Sonnen-Apotheke, Gräfelfing