

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Einfluss von Prostaglandin E₂ und dem
transformierenden Wachstumsfaktor- β auf die
plasmazytoide dendritische Zelle**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Meike Schäfer

aus Essen

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Hartmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Wollenberg
Prof. Dr. J. Herms

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med I. Bekeredjian-Ding
Prof. Dr. med. S. Endres

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2007

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das humane Immunsystem	1
1.1.1	Das angeborene und das adaptive Immunsystem	1
1.1.2	Toll-like Rezeptoren	2
1.2	Typ-I Interferon.....	5
1.2.1	Interferone – Amplifikatoren der angeborenen Immunität.....	5
1.2.2	Therapeutische Anwendung von Interferonen	6
1.3	Dendritische Zellen	7
1.3.1	Die plasmazytoide dendritische Zelle.....	8
1.3.2	Die plasmazytoide dendritische Zelle in der Pathophysiologie	9
1.3.3	Migrationsverhalten der plasmazytoiden dendritischen Zelle	10
1.4	CpG-Oligodesoxynukleotide	11
1.4.1	Geschichtlicher Hintergrund.....	11
1.4.2	Beschreibung drei verschiedener CpG-Klassen	12
1.4.3	CpG-Wirkungen auf das Immunsystem	14
1.4.4	Therapeutischer Einsatz von CpG-Oligodesoxynukleotiden.....	14
1.5	Tumorimmunologie	16
1.6	Prostaglandin E ₂	17
1.6.1	Biosynthese und Signaltransduktion von Prostaglandin E ₂	17
1.6.2	Die Wirkung von Prostaglandin E ₂ auf das Immunsystem	19
1.6.3	Die Rolle von Prostaglandin E ₂ in der Tumorigenese	19
1.7	Transformierender Wachstumsfaktor-β.....	20
1.7.1	TGF-β – Vorkommen und Signaltransduktion.....	20
1.7.2	Effekte von TGF-β auf das Immunsystem.....	22
1.7.3	Die Rolle von TGF-β in der Pathophysiologie von Tumoren.....	23
1.8	Fragestellung	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	25
2.1.1	Geräte	25
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	25
2.1.3	Reagenziensätze	26
2.1.4	Materialien für die Zellkultur	26
2.1.5	Zytokine / Chemokine	27
2.1.6	Medien und Puffer für die Zellkultur und Gelelektrophorese.....	27
2.1.7	Antikörper gegen humane Oberflächenmoleküle und Zytokine	27
2.1.8	Oligodesoxynukleotide	28

2.2	Immunologische Methoden	28
2.2.1	Zellisolation	28
2.2.2	Zellkultur.....	30
2.2.3	Kultivierung von Zelllinien	31
2.2.3.1	CD40-Ligand-Zelllinie	31
2.2.3.2	FADU- und PCI-Zelllinie	32
2.2.4	Migrationsassay	32
2.2.5	Durchflusszytometrie.....	32
2.2.5.1	Allgemeines Funktionsprinzip.....	32
2.2.5.2	Reinheit der plasmazytoiden dendritischen Zelle	33
2.2.5.3	Annexin-Färbung zum Ausschluss apoptotischer Zellen.....	34
2.2.5.4	Intrazelluläre Calcium-Messung	36
2.2.6	Zytokinquantifizierung per ELISA	36
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	37
2.3.1	Extraktion zytoplasmatischer RNA.....	37
2.3.2	Reverse Transkription und cDNA-Synthese	38
2.3.3	Polymerasekettenreaktion.....	38
2.3.4	Gelelektrophorese.....	40
2.4	Statistische Analyse	41
2.5	Software	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Überstände der Zelllinien FADU und PCI inhibieren die IFN- α Produktion.....	43
3.2	Einfluss des COX-Inhibitors Indometacin.....	44
3.3	Einfluss von PGE ₂ und TGF- β auf die Zytokin-Produktion.....	46
3.4	Suppression der IFN- α Antwort auch nach TLR 7-Stimulation durch PGE ₂	48
3.5	Forskolin zeigt die gleichen Effekte wie PGE ₂	49
3.6	PGE ₂ und Forskolin induzieren keinen Calcium-Flux.....	51
3.7	Identifizierung des EP ₂ -Rezeptors	52
3.8	Effekte verschiedener Prostanoid-Agonisten auf die PDC.....	53
3.9	Der ALK5-Inhibitor SB-431542 induziert IFN- α in PDCs.....	54
3.10	PGE ₂ induziert CD86, TGF- β induziert CD80	54
3.11	Migrationsverhalten der plasmazytoiden dendritischen Zelle	57
3.11.1	PGE ₂ vermindert die Expression von CCR7 auf der PDC	57
3.11.2	PGE ₂ erhöht die Expression von CXCR4 auf der PDC.....	58
3.12	TGF- β induziert IL-12.....	59

4	Diskussion	65
4.1	Einfluss von PGE ₂ und TGF-β auf die plasmazytoide dendritische Zelle	65
4.1.1	Zytokinprofil.....	65
4.1.1.1	Einfluss auf IFN-α und der Einsatz von COX-Inhibitoren	65
4.1.1.2	Einfluss auf andere Zytokine	67
4.1.2	Kostimulatorische Moleküle	68
4.1.3	Migrationsverhalten.....	69
4.1.4	ALK5-Inhibition als Induktor von IFN-α	70
4.1.5	cAMP als <i>second messenger</i> der PGE ₂ -Effekte	72
4.1.6	Identifikation vorhandener Prostanoid-Rezeptoren.....	73
4.1.7	TGF-β als Amplifikator der IL-12 Synthese	75
5	Zusammenfassung	79
6	Literaturverzeichnis	82
	Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	96
	Veröffentlichungen	98
	Danksagung	99
	Lebenslauf	100

1 Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem

Das humane Immunsystem ist ein komplexes System aus spezialisierten Zellen und Botenstoffen, die der Abwehr und somit dem Schutz des Körpers vor Krankheiten dienen. Da mögliche Angriffe sowohl von „außen“, z. B. durch Bakterien und Viren, als auch von „innen“, z. B. durch entartete Zellen drohen, muss das Immunsystem zwei wesentliche Aufgaben bewältigen: Zum einen das Unterscheiden von „Fremd“ und „Selbst“ und zum zweiten das zeitnahe Beseitigen abgestorbener Zellen und Fremdstoffe. Darüber hinaus muss ein Mechanismus zur Verfügung stehen, der ein schnelles Wiedererkennen beim erneuten Auftreten des gleichen Gefahrensignals ermöglicht.

1.1.1 Das angeborene und das adaptive Immunsystem

Immunantworten werden über zwei verschiedene Systeme geregelt, die sich beim Säugetier im Laufe der Evolution entwickelt haben. Man unterscheidet das angeborene und das erworbene (adaptive) Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ist eine sehr effiziente erste Abwehrlinie, die für den Schutz des Organismus in der Frühphase einer Infektion verantwortlich ist. Viele eingedrungene Erreger können durch die Zellen dieses Systems ohne zusätzliche Aktivierung weiterer spezifischer Schutzmechanismen effektiv eliminiert werden. Zu den Effektorzellen der angeborenen Immunität gehören vor allem die Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Granulozyten und B-Zellen. Diese Zellpopulationen tragen *pattern-recognition* Rezeptoren (PRRs) auf ihren Oberflächen, die in der Keimbahn kodiert sind. Ihre Spezifitäten sind somit genetisch festgelegt und können nicht verändert werden. Im Verhältnis zu der immensen Anzahl an körperfremden Substanzen erkennen diese Rezeptoren nur einige wenige - jedoch evolutiv hoch konservierte - repetitive Strukturen, die charakteristisch für Mikroorganismen sind. Diese Strukturen werden als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet und sind im normalen Wirtsorganismus nicht zu finden. Sie sind häufig überlebenswichtig für die Pathogene und halten deshalb jedem Selektionsdruck stand.

Oft ist es jedoch so, dass ein pathogener Erreger nicht alleine vom angeborenen Immunsystem unter Kontrolle zu bringen ist. Dieses Pathogen wird dann vom adaptiven Immunsystem bekämpft, das Erreger-spezifische Moleküle (Antigene) erkennt und eliminiert. Zum adaptiven Immunsystem gehören die T- und B-Lymphozyten, die sich dadurch auszeichnen, dass ihre Rezeptoren nicht Keimbahn-kodiert sind. Ihre Rezeptorspezifität wird durch Umlagerungen in den Rezeptor-kodierenden Genabschnitten definiert. Dies führt zu einer sehr hohen Rezeptor-Diversität. Im Laufe der Lebensspanne eines Organismus werden durch positive und negative Selektionsmechanismen nur diejenigen Rezeptoren ausgewählt, die zuverlässig ein Fremd-Antigen erkennen können. Aus einigen dieser antigenspezifischen Immunzellen bilden sich Gedächtniszellen aus, die zu einer schnellen Zweitantwort bei erneutem Antigenkontakt führen.

1.1.2 Toll-like Rezeptoren

Zu den wichtigsten Vertretern der PRRs, der „mustererkennenden“ Rezeptoren, gehören die Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Toll wurde erstmalig in *Drosophila melanogaster* als ein Gen identifiziert, das eine Rolle in der Embryogenese aber auch in der Abwehr von Pilzinfektionen spielte [Hashimoto et al. 1988, Lemaitre et al. 1996]. TLRs sind Transmembranmoleküle, die sowohl über eine extrazelluläre, Leucin-reiche Domäne (*leucin rich repeats*, LRRs) als auch über einen zytoplasmatischen Teil verfügen, der Sequenzhomologien zum IL-1-Rezeptor aufweist, und deshalb als TIR-Domäne (Toll/IL-1 Rezeptor) bezeichnet wird. Bis heute sind im Menschen zehn verschiedene TLRs bekannt [Hornung et al. 2002]. Jede Immunzelle weist ein spezifisches Repertoire an TLRs auf [Hornung et al. 2002], so dass unterschiedliche Immunzellsubpopulationen durch verschiedene mikrobielle Substanzen aktiviert werden können. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bisher identifizierten humanen TLRs und ihre Liganden.

TLR	LIGAND	URSPRUNG	REFERENZ
TLR1	Heterodimerisiert mit TLR2 Triacylierte LP	Bakt. Zellwand	
TLR2	Lipoproteine	Bakt. Zellwand	[Takeuchi et al. 1999a]
	Zymosan	Hefen	[Ozinsky et al. 2000]
	Lipoarabinomannan (LAM)	Mykobakterien	[Underhill et al. 1999]
TLR3	doppelsträngige RNA (dsRNA)	Viren	[Alexopoulou et al. 2001]
TLR4	LPS	Gramneg. Bakt.	[Poltorak et al. 1998]
	Protein F	RSV	[Kurt-Jones et al. 2000]
TLR5	Flagellin	Begeißelte Bakterien	[Hayashi et al. 2001]
TLR6	heterodimerisiert mit TLR2 Diacylierte LP	Bakt. Zellwand	[Takeuchi et al. 2000]
TLR7	R848, Imiquimod (Imidazoquinolin-Derivate), Guanosidanaloga, ssRNA	Viren, Bakterien, Fungi	[Hemmi et al. 2002], [Hornung et al. 2005]
TLR8	R848, einzelsträngige RNA (ssRNA)	unbekannt	[Jurk et al. 2002], [Heil et al. 2004]
TLR9	CpG-Motive	Bakterien, Viren	[Hemmi et al. 2000]
TLR10	unbekannt	unbekannt	

Tabelle 1 Übersicht TLR-Liganden modifiziert nach [Kaisho et al. 2002]

LPS: Lipopolysaccharid, ssRNA: single-stranded RNA, LP: Lipopeptide

TLR 7/8 erkennen einzelsträngige RNA, vermutlich viralen Ursprungs (z. B. Influenza- oder HI-Viren) während TLR 9 unmethylierte CpG-Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Motive viralen (z. B. Herpesviren) oder bakteriellen Ursprungs erkennt [Hemmi et al. 2000]. Im Gegensatz zu allen anderen TLRs befinden sich TLR 3/7/8/9 nicht auf der Zelloberfläche, sondern intrazellulär in endosomalen Kompartimenten. Der Kontakt dieser TLRs mit ihren Liganden erfolgt demnach über eine Endosom-vermittelte Internalisierung der Viren und Bakterien. Seit kurzem ist auch bekannt, dass es zusätzlich TLR-unabhängige Mechanismen zur Dektection viraler Nukleinsäuren gibt. Diese Sensoren befinden sich im Zytosol und erkennen vermutlich intrazelluläre Infektionserreger. Zu dieser Gruppe von Rezeptoren gehören die RNA-Helicasen *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) und das *melanoma differentiation-associated gene 5* (mda5), die beide doppelsträngige RNA erkennen [Ishii et al. 2006].

Nach der Aktivierung des TLR über seinen spezifischen Liganden kommt es zur Rekrutierung des Adaptormoleküls MyD88, das an die TIR-Domäne des jeweiligen TLR bindet. Dieser Komplex wird erweitert durch die Bindung von IRAK 1/4 sowie

TRAF 6. Von hier gehen zwei verschiedene Signalwege weiter, die zum einen über IRF 7 und zum anderen über MAP-Kinasen und NFκB laufen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Stimulation der plasmazytoiden dendritischen Zelle (PDC) über TLR 7 und TLR 9. Daher beschränkt sich Abbildung 1 auf die Signaltransduktionskaskade der endosomal lokalisierten TLR 7/8 und 9.

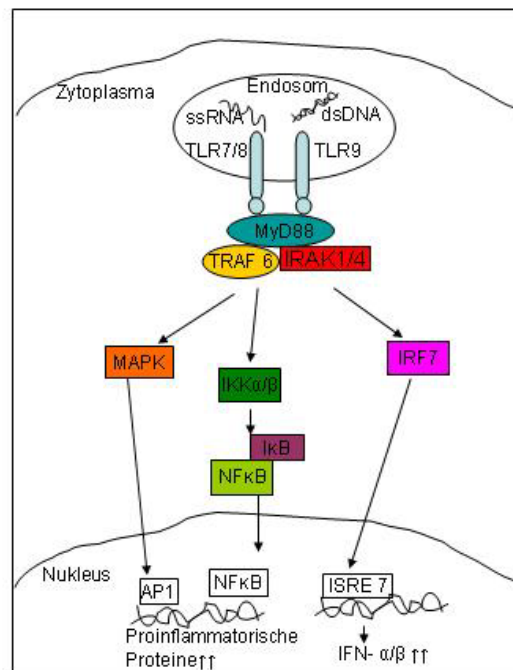


Abbildung 1 Signaltransduktionskaskade von TLR 7/8/9

Die spezifische Ligandenbindung an den TLR führt zur Assoziation des Adaptormoleküls MyD88 an die TIR-Domäne. Es erfolgt eine Rekrutierung von IRAK 1/4 sowie von TRAF 6. Dieser Komplex aktiviert zum einen IRF 7, das an ISRE 7 im Nukleus bindet und die Gentranskription von IFN-α/β Genen aktiviert. Zum anderen aktiviert dieser Komplex MAP-Kinasen und IKKα/β. Diese Kinase phosphoryliert das inhibitorische Protein IκB, so dass der freie NFκB-Komplex in den Nukleus wandern kann und die Ableitung von proinflammatorischen Zytokinen ermöglicht.

MyD88: myeloider Differenzierungsfaktor 88, **TRAF6:** Tumornekrose-Faktor Rezeptor-assoziiertes Faktor 6, **IRAK 1/4:** Interleukin-1 Rezeptor-assoziiertes Faktor 1/4, **IRF 7:** IFN-regulatorischer Faktor 7, **ISRE 7:** IFN-stimulierte response elements 7 **IKK:** IκB-Kinase, **NFκB:** nuclear factor κB, **MAPK:** Mitogen-aktivierte Proteinkinase, **AP-1:** aktivierendes Protein 1

1.2 Typ-I Interferon

1.2.1 Interferone – Amplifikatoren der angeborenen Immunität

1957 entdeckten Isaacs und Lindenmann, dass Zellen bei einer viralen Infektion ein Protein sezernierten. Sie bezeichneten es als „Interferon“, weil es mit der Virenreplikation in befallenen Zellen „interferierte“ und so ein Übergreifen auf nicht infizierte Zellen verhinderte [Isaacs und Lindenmann 1957]. Seitdem wurde eine ganze Familie von Interferon-Proteinen identifiziert und in Interferone (IFN) Typ-I und Typ-II klassifiziert. Der wichtigste Vertreter der Typ-II Interferone ist IFN- γ , welches hauptsächlich von stimulierten T- und NK-Zellen produziert wird. Zu den Typ-I Interferonen gehören IFN- α , IFN- β und IFN- ω . Sie werden auch als „antivirale“ Interferone bezeichnet. Im humanen Organismus wird IFN- α nur von PDCs gebildet, IFN- β hingegen von den meisten Zellen in kleinen Mengen. Als Antwort auf einen viralen Stimulus produzieren PDCs um den Faktor 10^3 mehr Typ-I IFN als alle anderen Immunzellen.

IFN- α/β und ω binden an den gleichen Interferon-Rezeptor (IFN- α R), der aus zwei Untereinheiten besteht [Katze et al. 2002, Biron 2001, Aguet 1991]. Der IFN- α -Rezeptor ist an eine Tyrosinkinase der Janusfamilie gekoppelt, die über die Phosphorylierung von *signal transducers and activators of transcription 1 and 2* (STAT 1/2) die intrazelluläre Signaltransduktion in Gang setzt. Die darauf folgende Aktivierung von *IFN-stimulated response elements* (ISREs) führt zum Ablesen der IFN-regulierten Gene, die einen antiviralen Status herbeiführen. Besondere Bedeutung werden dabei der dsRNA-stimulierten Proteinkinase (PKR) und der 2'-5'-Oligoadenylat-Synthase (OAS) beigemessen. PKR ist eine Serin-Threonin-Kinase, die die Translation der viralen Proteine inhibiert, OAS aktiviert hingegen die Ribonuklease-L (RNase-L), welche virale *messenger RNA* (mRNA) degradiert [Katze et al. 2002].

Neben diesen antiviralen Wirkungen leisten die Interferone aber auch einen wichtigen Beitrag zur Initialisierung und Regulation von Immunantworten und stellen außerdem ein wichtiges Bindeglied zwischen Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität dar. IFN- α/β steigern beispielsweise in allen Immunzellen die Expression von MHC Klasse-I Molekülen und somit die Präsentation von viralen Antigenen an CD8⁺-T-Zellen [Biron 2001]. Darüber hinaus amplifiziert es über eine positive *feedback* Schleife die erfolgte Immunantwort [Biron 2001].

Weitere Wirkungen von Typ-I IFN sind:

- Steigerung der Zytotoxizität von Makrophagen und NK-Zellen [Ortaldo et al. 1983]
- Induktion von IL-15 und damit Begünstigung der Proliferation von T-Gedächtnis-Zellen [Zhang et al. 1998]
- Förderung der spezifischen Antikörperproduktion von B-Zellen [Le Bon et al. 2001]
- Überlebensfaktor für T-Zellen [Marrack et al. 1999]

1.2.2 Therapeutische Anwendung von Interferonen

Der immunstimulierende, antiproliferative und antivirale Effekt von IFN- α wird bei verschiedenen Tumoren und viralen Erkrankungen therapeutisch genutzt. Zurzeit befinden sich verschiedene, in E.coli rekombinant hergestellte alpha-Interferone auf dem Markt, u.a. Interferon alpha-2a (Roferon®), Interferon alpha-2b (Intron A®) und Interferon alphacon-1 (Inferax®). Sie sind zur Behandlung folgender Erkrankungen zugelassen: Haarzell-Leukämie, Kaposi-Sarkom, chronisch-myeloische Leukämie, T-Zell-Lymphom, chronische Hepatitis B und C, Non-Hodgkin-Lymphom, Nierenzell-Karzinom und malignes Melanom. Darüber hinaus gibt es zwei mit Polyethylenglykol modifizierte Interferone (Pegasys®, PegIntron®), die aufgrund des höheren Molekulargewichts eine längere Halbwertszeit aufweisen und daher seltener appliziert werden müssen. Diese pegylierten Interferone sind lediglich zur Behandlung der Hepatitis C in Kombination mit Ribavirin zugelassen. Auf dem Markt befindet sich außerdem der TLR 7-Ligand Imiquimod (Aldara®), der zur lokalen Therapie genitaler Feigwarzen, ausgelöst durch das humane Papillomavirus, zugelassen ist. Die TLR-Stimulation führt zur IFN- α -Induktion im umgebenden Gewebe und induziert dadurch eine zelluläre Immunantwort.

Rekombinantes IFN- β wird bei der Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose eingesetzt. Auf dem Markt befinden sich Interferon β -1a (Avonex®, Rebif®) sowie Interferon β -1b (Betaferon®) [Vollmar et al. 2005].

1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind auf die Präsentation von Antigenen spezialisiert und können so Immunantworten initiieren. Diese Zellen befinden sich in fast allen peripheren Körpergeweben und analysieren ihre Umwelt permanent auf das Vorhandensein pathogener Erreger oder Moleküle.

Die Aufnahme von Pathogenen in die Zelle erfolgt in der Regel über Phagozytose bzw. Endozytose. Charakteristische Bestandteile werden nachfolgend intrazellulär prozessiert und auf der Zelloberfläche im *major histocompatibility complex* (MHC)-Komplex präsentiert. Die dadurch aktivierten DCs wandern nun in den nächstgelegenen drainierenden Lymphknoten ein. Dabei verlieren sie, im Zuge ihrer auf diese Aktivierung folgende Reifung, die Fähigkeit zur Antigenaufnahme und regulieren kostimulatorische Moleküle wie z. B. CD80/86 und CD40 auf (CD: *cluster of differentiation*). Im Lymphknoten folgt eine wechselseitige Interaktion der DCs mit naiven T-Zellen, die für das präsentierte Antigen einen spezifischen Rezeptor tragen. Die kostimulatorischen Moleküle dienen zusätzlich zum präsentierten Antigen als zweites notwendiges Signal für die Aktivierung der T-Zellen, um letztendlich eine effektive Immunantwort zu ermöglichen. Die Abwesenheit dieser kostimulatorischen Moleküle erzeugt andererseits eine Anergie bzw. Toleranz der T-Zellen gegenüber den präsentierten Antigenen. Dieser Schutzmechanismus bewahrt den Organismus vor möglichen Autoimmunprozessen. Im Lymphknoten kommt es nach erfolgreicher Aktivierung zur klonalen Expansion der für das Antigen spezifischen T-Zellen, die dann über die Lymphe oder das Blut zum Infektionsherd gelangen. Allgemein unterscheidet man Th₁- und Th₂-gerichtete Immunantworten. Th₁-Zellen bilden IFN- γ , welches eine zelluläre Immunantwort fördert. Th₂-Zellen produzieren IL-4/5 und unterstützen eine humorale Antwort.

Zu den Antigen-präsentierenden Zellen gehören DCs und B-Zellen. Die DCs werden anhand ihres myeloiden oder lymphatischen Ursprungs unterschieden. Im humanen System ist die myeloide DC (MDC) als lineage⁻, HLA-DR⁺⁺⁺, CD11c⁺ und CD123^{low} beschrieben. Die plasmazytoide DC (PDC) wird hingegen als lineage⁻, HLA-DR⁺⁺⁺, CD11c⁻ sowie CD123^{high} definiert [O'Doherty et al. 1994].

1.3.1 Die plasmazytoide dendritische Zelle

1958 beschrieben die beiden deutschen Pathologen Lennert und Remmele erstmals eine plasmazellartige Zelle in den T-Zellarealen von Lymphknoten [Lennert und Remmele 1958]. Es folgten zahlreiche Umbenennungen aufgrund immer speziellerer Charakterisierungen dieser Zellpopulation. 1999 entdeckten zwei Forschergruppen unabhängig voneinander, dass diese Zelle mit der als *interferon producing cell* (IPC) bezeichneten Zelle identisch war, die als Hauptproduzent von Typ-I IFN galt. Sie prägten den Namen der „plasmazytoiden dendritischen Zelle“ [Cella et al. 1999, Siegal et al. 1999].

PDCs sind vor allem in der Leber, im Thymus und im Knochenmark lokalisiert. Sie sind aber auch im peripheren Blut nachweisbar (0,1-0,7%). Diese Beobachtung legt nahe, dass sie in diesen primären lymphatischen Organen aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen. Nach dem Verlassen des Knochenmarks wandern PDCs in die T-Zell-reichen Areale der sekundären lymphatischen Organe ein. Wie in 1.1.2 erwähnt, exprimieren PDCs die Toll-like Rezeptoren 7 und 9, die beide endosomal lokalisiert sind und mikrobielle Nukleinsäuren erkennen. Sowohl TLR 7/9 als auch IRF 7 werden konstitutiv in PDCs exprimiert, so dass es über diese Faktoren besonders schnell zur PDC-Aktivierung kommt [Kato et al. 2005]. Nach Aktivierung produzieren PDCs innerhalb der ersten 24 Stunden große Mengen an Typ-I IFN, bis zu 10 pg/Zelle [Siegal et al. 1999]. Die Fähigkeit der PDCs Antigene aufzunehmen und zu prozessieren ist dagegen, im Vergleich zu anderen APCs, gering. Unreife PDCs exprimieren wenig MHC-II und kostimulatorische Moleküle. Nach Aktivierung durch Pathogene, synthetische TLR 7 oder 9-Liganden aber auch CD40-Ligand (CD40L, CD154) tritt ein Reifungsprozess ein, der die PDC phänotypisch zur dendritischen Zelle werden lässt, die in Interaktion mit T-Zellen treten kann. Erfolgt diese Reifung unter dem Einfluss von IL-3 (möglicherweise produziert durch Basophile und Eosinophile bei Infektionen mit Parasiten, aber auch von T-Zellen) bzw. IL-3 in Kombination mit CD40L, lässt sich eine Th₂-basierte Immunantwort beobachten. Virusinfizierte PDCs hingegen fördern durch die Ausschüttung von IFN- α die Entwicklung von IFN- γ - und IL-10-produzierenden T-Zellen (Th₁) [Rissoan et al. 1999]. Durch die Produktion verschiedener Zytokine (IFN- α , IL-6, IL-8, TNF- α) kann die PDC viele andere Effektorzellen des Immunsystems aktivieren [Kadowaki and Liu 2002]. Dazu gehören MDCs, Makrophagen, NK-Zellen, NKT-Zellen und T-Zellen [Ito et al. 2001; Rothenfusser et al. 2001]. Die PDC selber kann jedoch auch IL-12 über Stimulation mit CpG-B und CD40L produzieren [Krug et al. 2001b].

Die PDC hat also sowohl die Fähigkeit als Effektorzelle des angeborenen Immunsystems zu fungieren als auch als Antigen-präsentierende Zelle das erworbene Immunsystem zu aktivieren.

1.3.2 Die plasmazytoide dendritische Zelle in der Pathophysiologie

Es gibt Berichte, nach denen die PDC eine Rolle in der Pathogenese von HIV-Infektionen (*human immuno-deficiency virus*), Autoimmun - und Tumorerkrankungen spielt.

PDCs exprimieren die Moleküle CD4, sowie die für die HIV-Infektion essentiellen Rezeptoren CXCR4 und CCR5 [Penna et al. 2001]. PDCs können demnach vom HI-Virus infiziert werden. Studien zeigen, dass Zellen von HIV-Patienten eine verminderte Fähigkeit zur IFN- α -Produktion aufweisen [Lopez et al. 1983, Siegal et al. 1986], ebenso ist die generelle Zahl von PDCs bei diesen Patienten verringert [Pacanowski et al. 2001]. Die Abnahme der PDC-Population korreliert mit einer erhöhten Viruslast und der Zunahme von opportunistischen Infektionen sowie dem Auftreten des Kaposi-Sarkoms [Soumelis et al. 2001].

Der Zusammenhang zwischen von PDCs produziertem IFN- α und dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) stützt sich auf zwei Beobachtungen. Patienten unter IFN- α -Therapie können einen SLE entwickeln und SLE-Patienten weisen häufig einen erhöhten Serumspiegel an IFN- α auf [Ytterberg und Schnitzer 1982]. Die absolute Zahl an zirkulierenden PDCs ist zwar erniedrigt, in den Hautläsionen jedoch finden sich vermehrt PDCs, die enorme Mengen an IFN- α produzieren [Ronnblom und Alm 2001]. Die Aktivierung dieser hautinfiltrierenden PDCs erfolgt über Immunkomplexe aus anti-doppelsträngiger DNA und der DNA apoptotischer Zellen [Vallin et al. 1999a, Vallin et al. 1999b].

In der Tumorigenese beobachtet man die Infiltration von unreifen PDCs in solide Tumoren [Vermi et al. 2003, Hartmann et al. 2003a]. Diese PDCs sind unfähig T-Zellen zu aktivieren und induzieren stattdessen die Bildung von T-regulatorischen Zellen (T_{regs}) [Zou et al. 2001b]. Neuere Studien zeigen, dass PDCs in tumordrainierenden

Lymphknoten Indoleamine-2,3-dioxygenase produzieren, welches eine lokal immunsuppressive Wirkung auf umliegende T-Zellen hat [Munn et al. 2004].

1.3.3 Migrationsverhalten der plasmazytoiden dendritischen Zelle

Nach der Aktivierung durch verschiedene Stimuli werden PDCs zur Migration in den nächstgelegenen Lymphknoten angeregt, um dort mit anderen Lymphozytenpopulationen in Interaktion zu treten. Diese Migration wird durch Chemokine ausgelöst - eine Familie von kleinen, sekretierten Peptiden, die die besondere Fähigkeit besitzen, Lymphozyten zum Wandern zu bringen. Diese gerichtete Bewegung entlang eines Gradienten eines bestimmten Chemokins nennt man Chemotaxis.

PDCs exprimieren folgende Chemokin-Rezeptoren:

- CCR2, CCR3, CCR5, CCR7, CXCR2, CXCR3, CXCR4 [Penna et al. 2002, McKenna et al. 2005].

In dieser Arbeit werden im Folgenden zwei Rezeptoren genauer untersucht, die bei der Chemotaxis der PDC eine bedeutende Rolle spielen.

- **CCR7-Rezeptor** (das mittlere C steht für ein Cytosin im Zentrum des Rezeptors). Die Liganden dieses Rezeptors sind die Chemokine CCL19 (*MIP-3 α*) und CCL21 (*6CKine*). Diese werden im Lymphknoten im Bereich der *high endothelial venules* (HEV) exprimiert, dem Übergangsort der Immunzellen aus dem Blut ins lymphatische System. Die Migration auf diese Liganden in Richtung Lymphknoten wird als *homing* bezeichnet.
- **CXCR4-Rezeptor** gehört zur Familie der C-X-C-Rezeptoren, die eine andere Aminosäure als Cytosin im Zentrum aufweisen. Der Ligand für diesen Rezeptor ist *stromal-derived-factor 1* (SDF-1, CXCL12). Dieser Faktor wird häufig von Tumoren exprimiert und findet sich z.B. in sehr hoher Konzentration in Tumorascites [Zou et al. 2001b]. Eine Expression dieses Liganden sorgt für eine Migration, die entgegengesetzt zu der von CCR7 verläuft.

1.4 CpG-Oligodesoxynukleotide

1.4.1 Geschichtlicher Hintergrund

Im Jahre 1866 beobachtete Wilhelm Busch, Chirurg an der Universitätsklinik Bonn, dass sich Tumore beim gleichzeitigen Vorliegen bakterieller Infektionen zurückbilden konnten. Zwei Dekaden später wurde dieses Konzept von Sir William Coley (Rockefeller University, New York) aufgegriffen und an einem größeren Probandenkollektiv weiterentwickelt. Coley zeigte, dass die intratumorale Injektion bakterieller Lysate eine Rückbildung von Tumoren bewirkt [Coley 1991, Nauts und McLaren 1990]. Dieser Ansatz geriet allerdings kurz darauf in Vergessenheit, weil besser zu standardisierende und leichter zu handhabende Therapien wie z. B. die Strahlentherapie in den Mittelpunkt des Interesses rückten.

1984 zeigten Tokunaga et al., dass die Vakzinierung mit dem attenuierten Mykobakterium bovis Stamm Bacille Calmette-Guérin (BCG) eine Anti-Tumor-Wirkung besitzt [Tokunaga et al. 1984]. Diese Applikation wurde als Standardtherapie für das Blasenkarzinoms eingeführt, obwohl die genauen Wirkmechanismen bis dato ungeklärt waren [Morales et al. 1976]. Tokunaga und Kollegen trennten das Lysat von BCG in verschiedene Fraktionen auf und konnten zeigen, dass die immunstimulatorische Wirkung von der mykobakteriellen DNA herrührt, da die Wirkung mit DNAsen zerstört werden kann [Tokunaga et al. 1999]. Eine andere japanische Arbeitsgruppe um Yamamoto deckte auf, dass bakterielle DNA im Gegensatz zur Vertebraten-DNA eine immunstimulatorische Wirkung hat [Yamamoto et al. 1992]. Im Folgenden gelang es die aktiven Sequenzen innerhalb der bakteriellen DNA einzugrenzen und es zeigte sich, dass alle eine Palindromsequenz aufwiesen (spiegelbildliche Anordnung der Basen um ein zentrales Dinukleotid). Nach diesem Muster entwickelte, synthetische Oligodesoxynukleotide (ODN) wirkten ebenfalls immunstimulierend.

Einen weiteren großen Schritt brachte die Beobachtung von Arthur Krieg 1995, dass einige Antisense-ODN immunstimulatorische Aktivität aufwiesen, sie induzierten eine starke Proliferation von B-Zellen [Krieg et al. 1995]. Die genauere Analyse dieses Phänomens brachte die Erkenntnis, dass alle aktiven Sequenzen ein Cytidin-Guanosin Dinukleotid (CpG, p bezeichnet die Phosphatbindung) aufwiesen und dass ein Palindrom, wie ursprünglich angenommen, nicht zwingend notwendig war. Der Grund für die unterschiedliche Immunogenität bakterieller und Vertebraten-DNA liegt in ihrem

Aufbau. Ein Unterschied ist die Frequenz der CpG-Motive: Bakterielle DNA weist die statistisch erwartete Verteilung von 1 zu 16 CG-Dinukleotiden auf, während diese mit 1 zu 60 in der Wirbeltier-DNA stark unterrepräsentiert ist. Die CpG-Motive sind daher ein charakteristisches Merkmal mikrobieller DNA, so dass das Vertebraten-Immunsystem sie als Erkennungsmotiv für einen eindringenden mikrobiellen Erreger nutzen kann. Darüber hinaus sind 70-80% der Cytosine in der Wirbeltier-DNA in 5'-Position methyliert, während die DNA mikrobiellen Ursprungs unmethyliert bleibt. Tatsächlich erkennt das Vertebraten-Immunsystem unmethylierte CpG-Motive und eine Methylierung des Cytosins in synthetischen ODN führt zu einer stark verminderten Immunwirkung. Es zeigte sich, dass zwischen den Spezies Unterschiede in der Aktivierung auf verschiedene Sequenzen bestehen. Im humanen System stellte sich für eine optimale Stimulation das minimal erforderliche Motiv mit dem Hexamer 5'-GTCGTT-3' als besonders potent heraus [Hartmann und Krieg 2000], im murinen System wirkt dagegen das Motiv 5'-GACGTT-3' optimal stimulierend [Bauer et al. 2001].

1.4.2 Beschreibung drei verschiedener CpG-Klassen

In Screening-Versuchen stellte sich heraus, dass sich aufgrund unterschiedlicher Sequenzen und der dadurch bedingten strukturellen Profile verschiedene Klassen von ODN definieren lassen. Eine weitere Rolle spielt auch die Modifizierung der normalerweise vorliegenden Phosphodiester-Bindung (PO) zwischen den einzelnen Nukleotiden. Im Hinblick auf eine erhöhte Nukleasestabilität wurde die Phosphorothioat-Modifikation (PTO) eingeführt. Dabei wurde ein nicht an der Bindung beteiligtes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom substituiert. Diese PTO-ODN sind aufgrund ihrer Stabilität auch zur *in vivo*-Applikation geeignet.

Bisher konnten drei verschiedene Klassen anhand ihres aus differenziellen Sequenzeigenschaften resultierenden unterschiedlichen immunstimulatorischen Profils definiert werden:

CpG-A (auch: CpG-D), Prototyp ODN 2216 [Krug et al. 2001a]

- ODN 2216: 5'-GGgggacgatcgtcGGGGGg-3'
- Palindrom im Zentrum (unterstrichen)
- Poly-Guanosine am 5'-und 3'-Ende; verbessern die zelluläre Aufnahme [Dalpke et al. 2002] und die NK-Aktivierung
- der chimäre Aufbau aus PTO-gebundenen Poly-G Resten und PO-gebundenem Palindrom unterstützt die Ausbildung von partikulären Sekundärstrukturen, bewirkt eine hohe IFN- α -Freisetzung aus PDCs sowie eine starke Aktivierung von NK-Zellen (bei angemessener Nukleasestabilität)
- keine bis schwache B-Zellaktivierung

CpG-B (auch: CpG-K), Prototyp ODN 2006 [Krieg 2002]

- ODN 2006 : 5'-**TCGT**CG**TTTTGT**CG**TTTTGT**CG**TT-3'**
- einzelsträngig, humanes Motiv mehrfach vorhanden
- vollständig PTO modifiziert
- starke B-Zellproliferation, wenig NK-Zellaktivierung
- wenig IFN- α -Induktion in der PDCs, aber Reifung und TNF- α -Induktion
- wird als ProMune® bereits in klinischen Studien Phase III für die Behandlung von nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom getestet

ODN der Klasse C vereinen die Effekte der Klassen A und B.

CpG-C, Prototyp ODN M362 [Hartmann et al. 2003b, Marshall et al. 2003, Vollmer et al. 2004]

- ODN M362 : 5'-TCGT**CGTCGTT**CGA**AC**GAC**G**TTGAT-3'
- vollständig PTO modifiziert, mehrere CpG-Motive
- Palindrom im Zentrum (unterstrichen)
- induziert sowohl IFN- α in der PDC als auch die Produktion von IL-6 und Ig-M durch die B-Zelle
- wird als Actilon® in klinischen Studien Phase I gegen Hepatitis C getestet

1.4.3 CpG-Wirkungen auf das Immunsystem

Die Erkennung der unmethylierten CpG-Motive erfolgt über den Toll-like Rezeptor 9, der im humanen System lediglich von PDCs und B-Zellen exprimiert wird. Die Aktivierung dieser Zellen führt sekundär über sezernierte Botenstoffe und kostimulatorische Moleküle zur Aktivierung akzessorischer Zellen. Eine systemische CpG-Gabe führt zu einer starken Th₁-Polarisierung mit hohen IFN- γ und IL-12-Spiegeln [Klinman et al. 1996].

- B-Zellen

Humane B-Zellen werden z. B. von ODN 2006 zur Proliferation angeregt. Des Weiteren steigert CpG-DNA die IL-6 und IL-10-Produktion, welche für die Differenzierung in die Antikörper-produzierende Zelle notwendig sind [Yi et al. 1996b]. Weiterhin ist eine gesteigerte Expression von Oberflächenmolekülen wie MHC-I/II, CD40, CD54 und Fc γ -Rezeptor zu beobachten [Krieg et al. 1995]. Neben diesen stimulatorischen Effekten verhindert die CpG-Gabe auch den programmierten Zelltod [Yi et al. 1996a].

- PDCs

Die Stimulation mit CpG-DNA führt hier zur Aufregulation kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und CD40. Außerdem stimuliert CpG-DNA die Synthese verschiedener Zytokine wie IFN- α , IL-6, TNF- α und IFN- β [Krug et al. 2001a] und von Chemokinen wie IL-8 und IP-10. Die Kombination von CpG-B und CD40L führt zur Ausschüttung von IL-12 [Krug et al. 2001b]. Die durch CpG-induzierten Zytokine bewirken eine Th₁-gerichtete Immunantwort.

1.4.4 Therapeutischer Einsatz von CpG-Oligodesoxynukleotiden

- Tumortherapie

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass eine CpG-Applikation das Tumorstadium signifikant hemmt oder auch zu einer kompletten Remission der Tumore führen kann [Carpentier et al. 1999]. Schon eine einmalige peritumorale Gabe führt zu einer Infiltration von Makrophagen, NK-Zellen und CD8⁺-Zellen. Das sich

entwickelte immunologische Gedächtnis kann eine erneute Ausbildung von Tumoren verhindern [Carpentier et al. 2000]. In einem Melanommodell gelang es, eine Vakzine aus Tumor-assoziiertem Antigen und dazugehörigem T-Zell-Epitop in der Effektivität um das 10-100 fache zu steigern [Davila und Celis 2000]. Interessant ist ebenfalls der Ansatz, dass monoklonale Antikörper, die erfolgsversprechend gegen Tumorantigene eingesetzt werden, in ihren therapeutischen Erfolgen in der Kombination mit CpG-DNA noch verbessert werden können.

- Allergie

Allergien sind definiert als eine überschießende Immunreaktion des Körpers, die durch die erhöhte Produktion der Th₂-Zytokine IL-4/5 sowie einer vermehrten IgE-Synthese gekennzeichnet ist [Sears et al. 1991]. Im Umkehrschluss heißt das, dass eine Therapie, die ein Th₁-Zytokinmilieu schafft, eine Allergie positiv beeinflussen kann bzw. prophylaktisch den Ausbruch einer solchen verhindert. CpG-DNA hat diesen Effekt, indem sie die Freisetzung von IFN- γ und IL-12 (den typischen Th₁-Zytokinen) fördert [Sur et al. 1999]. Die gebildeten Th₁-Zytokine induzieren bei B-Zellen einen *isotype switch* zu IgG_{2a} anstelle von IgE. Kline zeigt 1998 zum ersten Mal, dass die Kombination von CpG-DNA mit einem starken Allergen (hier: Hausstaubmilben) ein Ausbrechen von allergischem Asthma verhindern kann bzw. eine deutliche Abschwächung der Symptome ermöglicht [Kline et al. 1998]. Eine Therapie mit CpG-ODN bekämpft demnach die Ursachen einer Allergie und nicht die Symptome, wie es bisherige auf dem Markt befindliche Präparate tun.

- Impf-Adjuvans

CpG-DNA induziert die Produktion von Th₁- und proinflammatorischen Zytokinen, zusätzlich lässt sie Antigen-präsentierende Zellen reifen und aktiviert diese. Es wurde vermutet, dass CpG-DNA auch die Immunogenität eines zeitgleich verabreichten Antigens steigern könnte [Klinman et al. 1999b]. In Mausexperimenten zeigte sich, dass die Ko-Administration von CpG-B zu Vakzinen gegen Influenzaviren, Masernviren, Hepatitis-B-Oberflächenantigen oder dem Tetanustoxoid einen dreifach höheren spezifischen Antikörper-Titer bewirkt [Davis et al. 1998, Eastcott et al. 2001]. Zwei klinische Studien sind bereits an humanen Probanden durchgeführt worden. In der ersten Studie wurden gesunde Erwachsene mit Engerix B®, einem Hepatitis B Impfstoff, immunisiert. Die Gruppe, die zusätzlich CpG-B erhielt, wies nach der ersten und zweiten Impfung einen signifikant höheren Antikörper-Titer auf [Halperin et al. 2003]. Die Impfung mit Fluarix®, einem Grippeimpfstoff, in Kombination mit CpG-B

zeigte das Phänomen, dass lediglich die Probanden, die bereits Influenza-Viren spezifische Antikörper aufwiesen, von erhöhten spezifischen Serumspiegeln profitierten [Klinman et al. 2000]. Zurzeit befindet sich VaxImmune® (Coley Pharmaceuticals), ein Impf-Adjuvans bei Tumorerkrankungen, in Phase-I Studien.

- Immunprotektiver Effekt

Die über CpG-DNA erreichte Aktivierung des angeborenen Immunsystems, kann im Mausmodell effektiv vor einer nachfolgenden Infektion schützen. Mäuse, die im Vorfeld mit bakterieller DNA oder CpG-DNA behandelt werden, sind resistent gegen die Infektion mit *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes* und *Francisella tularensis* [Krieg et al. 1998a, Klinman et al. 1999b] sowie Ebola-, Herpes- und Zytomegalieviren [Ashkar et al. 2003]. Auch gegenüber Protozoen wie *Plasmodium yoelii* und Leishmanien wird ein protektiver Effekt beobachtet [Zimmermann et al. 1998]. Dieser wird massgeblich über die PDC vermittelt, da PDC-defiziente Mausstämme diesen Schutz nicht ausbilden können [Ishii et al. 2005].

1.5 Tumorimmunologie

Paul Ehrlich postulierte bereits Anfang des 19. Jahrhunderts, dass das körpereigene Immunsystem bei der Erkennung und Bekämpfung von Tumoren eine entscheidende Rolle spielt. Burnet und Thomas stellten eine halbe Dekade später die Theorie der Überwachung von Tumoren durch das Immunsystem auf (*immunosurveillance*) [Burnet 1957]. Diese besagt, dass das humane Immunsystem maligne Zellen erkennen und abtöten kann. Ein wachsender Tumor stellt demnach eine Ausnahme dar und ist begründet in der Fähigkeit des Tumors den Kontrollmechanismen des Körpers zu entkommen (*immune escape*). Um der Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen bedient sich der Tumor eines Phänomens, das als *immune editing* bezeichnet wird. Durch verschiedene Mechanismen werden die Immunzellen in der unmittelbaren Umgebung des Tumors in einen Zustand versetzt, der sie unfähig macht die Tumorzellen zu erkennen und zu bekämpfen.

Folgende molekulare Mechanismen werden u.a. diskutiert:

- Mutation von Tumorantigenen [Stackpole et al. 1980]
- Reduktion bzw. völliges Fehlen der MHC Klasse-I Moleküle [Algarra et al. 2004]
- Defekte im *signaling* durch den Todesrezeptor CD95 [French und Tschopp 2002] oder Expression anti-apoptotischer Moleküle
- Fehlende Aufregulation kostimulatorischer Moleküle [Schwartz 1990]
- Produktion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10, TGF- β und anderen Substanzen wie Prostaglandin E₂ (PGE₂) [Toutirais et al. 2003]
- Generierung von T_{regs}

1.6 Prostaglandin E₂

1.6.1 Biosynthese und Signaltransduktion von Prostaglandin E₂

Prostaglandin E₂ ist ein Lipid, das aus Membranphospholipiden entsteht. Phospholipase A₂ (PLA₂) setzt aus Membranphospholipiden die C₂₀-ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure frei [Smith et al. 1991], die in einem weiteren Schritt durch die Cyclooxygenase (COX)-1 und 2 zu instabilem Prostaglandin (PG) H₂ oxidiert wird [Smith et al. 1991]. Aus diesem PGH₂ entstehen durch verschiedene Prostaglandinsynthasen weitere Prostaglandine wie PGE₂, PGD₂ und PGF_{2 α} , aber auch Thromboxan A₂ (TxA₂) und Prostacyclin (PGI₂) (Abbildung 2). Diese COX-Produkte werden auch als Prostanoid oder Eicosanoide bezeichnet.

COX-1 wird konstitutiv in vielen Geweben exprimiert und ist für wichtige physiologische Vorgänge wie z. B. dem Schutz der gastrointestinalen Mukosa verantwortlich. COX-2 hingegen wird nur im Gehirn, den Nieren und der Prostata konstitutiv exprimiert, sie ist jedoch über verschiedene Entzündungsmediatoren (z. B. LPS, IL-1, TNF- α) induzierbar [Morham et al. 1995]. Die physiologische Funktion der seit kurzem bekannten COX-3 ist noch weitgehend unbekannt. PGE₂ wird endogen von vielen Zellen des Körpers produziert, u.a. von Fibroblasten, Makrophagen und malignen Zellen.

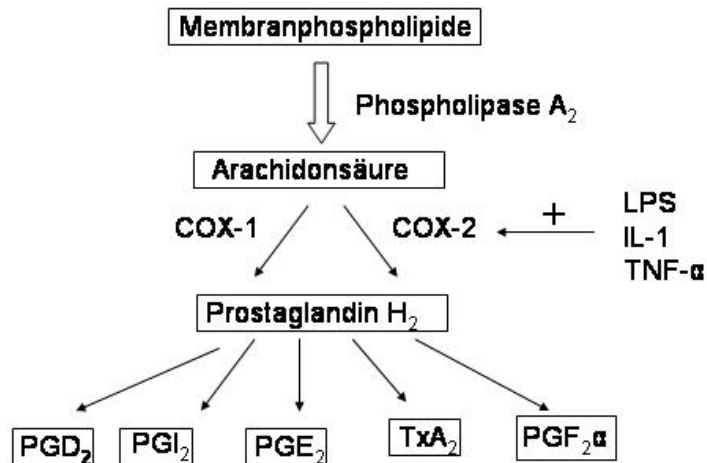


Abbildung 2 Biosynthese von Prostaglandinen

PGE₂ vermittelt seine Wirkungen über die Prostaglandin E-Rezeptoren EP₁₋₄. Dies sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren vom Rhodopsin-Typ [Coleman et al. 1994]. Sie weisen eine extrazelluläre N-terminale Domäne, sieben Transmembranregionen sowie eine intrazelluläre C-terminale Domäne auf. Die Rezeptoren sind an heterotrimere G-Proteine gebunden, die mittels sekundärer Botenstoffe das extrazelluläre Signal in ein intrazelluläres Signal umwandeln. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Rezeptoren, ihre *second messenger* sowie ihre natürlichen und synthetischen Liganden [Harris et al. 2002]. Da der EP₃-Rezeptor viele *splice*-Varianten aufweist, ist auch eine Vielzahl an Signaltransduktionskaskaden möglich. Die *splice*-Varianten haben aber keinen Einfluss auf die Affinität der Liganden [Ushikubi et al. 1995].

Name	Natürlicher Ligand	Intrazelluläres Signal	Synthetischer, spezifischer Ligand
EP ₁ R	PGE ₂	IP ₃ ↑, Ca ²⁺ ↑ via G _q	Sulprostone
EP ₂ R	PGE ₂	cAMP↑ via G _s	Butaprost
EP ₃ R	PGE ₂	cAMP↓ via G _i cAMP↑ via G _s Phosphatidylinositol	Sulprostone
EP ₄ R	PGE ₂	cAMP↑ via G _s	11-deoxy-PGE ₁ (auch EP ₂)

Tabelle 2 Übersicht der EP-Rezeptoren und ihrer spezifischen Liganden

IP₃: Inositol-3 Phosphat, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat

1.6.2 Die Wirkung von Prostaglandin E₂ auf das Immunsystem

PGE₂ moduliert die Funktion vieler Zellen des Immunsystems, wobei es im Allgemeinen eine immunsuppressive Wirkung besitzt. PGE₂ verschiebt die Immunantwort zugunsten einer Th₂-Antwort (IL-4/6/10) indem es die Bildung von Th₁-Zytokinen (TNF- α , IFN- γ und IL-2) hemmt [Hilkens et al. 1996]. Die verbleibende Th₂-basierte Immunantwort ist nicht in der Lage, einen Tumor effektiv zu bekämpfen. In der Anwesenheit von PGE₂ produzieren DCs kaum noch IL-12, stattdessen steigt die Synthese des immunsuppressorisch wirkenden IL-10 an [Huang et al. 1998, Harizi et al. 2002]. PGE₂ fungiert weiterhin als autokriner positiver *feedback* Regulator, da es seinerseits die Expression von COX-2 induziert.

1.6.3 Die Rolle von Prostaglandin E₂ in der Tumorigenese

Eine Überexpression von COX-2 und die damit verbundene erhöhte Produktion von PGE₂ werden in verschiedenen malignen Erkrankungen wie Prostatakrebs, Mammakarzinom [Rolland et al. 1980] und Dickdarmkrebs [Rigas et al. 1993] beobachtet. Generell wird PGE₂ in Tumorgewebe in weitaus höherer Konzentration als in normalem Gewebe gefunden. COX-2 ist ein *early response* Gen, das von Tumorpromotoren, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und durch Hypoxie induziert werden kann.

Nachfolgend werden Mechanismen vorgestellt, die die Rolle der COX bei der Tumorentwicklung veranschaulichen:

- Apoptoresistenz

PGE₂ induziert die Bildung von anti-apoptotischen Proteinen wie z. B. Bcl-2

- Angiogenese

Eine Überexpression von COX-2 führt direkt zur Produktion von *vascular endothelial growth factor* (VEGF), dem stärksten bekannten proangiogenetischen Faktor [Harada et al. 1994].

- Invasivität

Induktion von Matrixmetalloproteasen (MMP), die als degradierende Enzyme bei der Metastasierung eine Rolle spielen.

Aufgrund dieser vielfältigen Beteiligung der COX-2 an Tumorentwicklung und -progression ermöglicht die gezielte Hemmung der COX einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz. Eine der ersten Beobachtungen in diesem Zusammenhang war, dass unter Langzeittherapie mit nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) das Risiko an Dickdarmkrebs zu erkranken um 40-50% gesenkt werden konnte [Smalley und DuBois 1997]. NSARs wie Indometacin oder Acetylsalicylsäure blockieren die COX-1 und 2 und hemmen so die PGE₂-Synthese. Vom Einsatz COX-2-selektiver Inhibitoren (z. B. Rofecoxib und Celecoxib) versprach man sich außerdem eine Abnahme der gastrointestinalen Nebenwirkungen. Studien mit diesen selektiven COX-2 Hemmern zeigten vielversprechende Ergebnisse bei der Größenreduktion von Tumoren [Ding et al. 2000]. Ebenso konnte eine verminderte Migration und Adhäsion maligner Zellen unter COX-2 Hemmern festgestellt werden [Rozic et al. 2001]. Allerdings steht diese Arzneimittelgruppe seit Mitte des Jahres 2004 im Zusammenhang mit dem erhöhten Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse und Herzinfarkten. Dies hängt möglicherweise mit der durch die COX-2 Hemmung ebenfalls verursachten verminderten Produktion von antithrombotischem Prostacyclin und der gleichzeitig unveränderten Produktion von TxA₂ zusammen. Dies verändert die Homöostase der Blutgerinnung [Cheng et al. 2002]. Neuere, alternative Angriffspunkte zur Reduktion von PGE₂-Spiegeln sind die Hemmung der PGE-Synthasen, so dass andere Prostaganoide weiterhin produziert werden können sowie darüber hinaus die spezifische Blockade von EP-Rezeptoren.

1.7 Transformierender Wachstumsfaktor- β

1.7.1 TGF- β – Vorkommen und Signaltransduktion

Beim transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) handelt es sich um ein pleiotropes Zytokin, welches je nach Zelltyp und Differenzierungsstadium stark unterschiedliche Wirkungen aufweist. TGF- β spielt eine wesentliche Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von embryonalem und adultem Gewebe, sowie bei der Wundheilung, Angiogenese und in Entzündungsprozessen. Im humanen System sind drei Isoformen bekannt (TGF- β_1 , TGF- β_2 und TGF- β_3) die von verschiedenen Genen kodiert werden [Govinden und Bhoola 2003]. TGF- β_1 ist die im Immunsystem vornehmlich exprimierte Isoform [Derynck et al. 1987].

TGF- β liegt hauptsächlich in der Form des latenten Komplexes vor [Roth et al. 1998]. Dieser besteht aus dem *latent TGF- β binding protein* (LTBP) welches kovalent über Disulfidbrücken an das *latency-associated peptide* (LAP) bindet, das wiederum eine nicht-kovalente Bindung mit einem homodimeren TGF- β eingeht [Miyazono und Heldin 1991]. In diesem Komplex bleibt TGF- β an die extrazelluläre Matrix gebunden, wird dort gespeichert und erst bei Aktivierung freigesetzt [Taipale et al. 1998]. TGF- β kann nur in der aktiven Form an seinen Rezeptor binden. *In vitro* kann man die Abspaltung aus dem Komplex durch extreme pH-Werte, Hitze oder verschiedene Proteasen erreichen [Miyazono und Heldin 1991]. Wie die Spaltung *in vivo* erfolgt ist unklar, vermutet werden proteolytische Mechanismen wie die Freisetzung durch Plasmin oder Konformationsänderungen von z. B. LAP durch das Bindungsprotein Thrombospondin [Lyons et al. 1990]. Die Wirkungen von TGF- β können sowohl parakrin als auch autokrin sein.

Das TGF- β -*signaling* läuft über den TGF- β Rezeptor, einem Komplex aus zwei Typen von Serin/Threonin-Kinasen. Dieser Komplex ist ein Heterodimer aus dem TGF- β -Rezeptor Typ-I (TGF β RI) und TGF- β -Rezeptor Typ-II (TGF β RII). Es gibt lediglich einen Typ-II Rezeptor, jedoch 5 Typ-I Rezeptoren, die zur Familie der *activin receptor like kinasen* (ALK) gehören. TGF- β vermittelt seine Wirkungen meist über einen Komplex aus ALK5 und TGF β RII. TGF β RIII (Betaglycan) spielt lediglich eine Rolle bei der Bindung von TGF- β_2 an TGF β RII. TGF- β bindet an TGF β RII, der wiederum ALK5 bindet und phosphoryliert. ALK5 phosphoryliert die intrazellulären *similar to mothers against decapentaplegic* (Smad) Proteine 2 und 3, die mit Smad 4 assoziieren [Inman et al. 2002b] und in den Nukleus wandern, um dort *smad binding elements* (SBE) zu aktivieren. Die alleinige Bindung von Smads an die SBEs ist allerdings zu schwach, so dass der Komplex noch andere Transkriptionsfaktoren rekrutiert. Aktivierend wirken Koaktivatoren mit histone-acetyl-Transferase-Aktivität, inhibierend auf die Transkription wirken histone-deacetylase Aktivität beinhaltende Repressoren [Massague 2000]. Die anti-Smads 6 und 7 antagonisieren die Aktivität des Smad 2/3/4 Komplexes, in dem sie die Phosphorylierung von Smad 2 durch ALK5 verhindern. Freies Smad 7 liegt im Nukleus vor und schützt die responsiven Gene vor Expression (Abbildung 3). Experimente mit Smad-defizienten Zellen oder mutierten ALK5 Rezeptoren zeigen, das TGF- β auch über einen Smad-unabhängigen Signalweg wirken kann. Zum heutigen Zeitpunkt ist jedoch noch nicht klar, über welche Schlüssel-moleküle diese Signale vermittelt werden. Zur Diskussion stehen MAP-Kinasen [Massague 2000] und die Aktivierung des Ras-Erk-*pathways* sowie PI3-Kinasen, JNK und Rho [Wakefield und Roberts 2002].

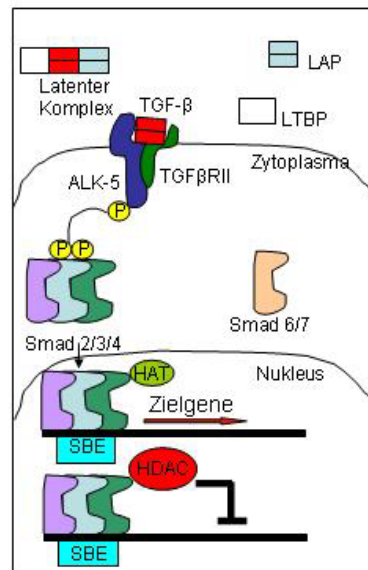


Abbildung 3 TGF- β -signaling

TGF- β wird aus dem „latentem Komplex“ freigesetzt, bindet an den heteromeren Rezeptor, der sich selbst phosphoryliert. ALK5 phosphoryliert danach Smad 2, das einen Komplex mit Smad 3 und Smad 4 bildet. Das so entstandene Trimer wandert in den Nucleus, wo es an SBE bindet. Die Rekrutierung von Koaktivatoren mit HAT-Aktivität induziert die Ablesung der Zielgene, die Rekrutierung von HDAC-Aktivität aufweisenden Repressoren blockiert die Ablesung spezieller Gene.

ALK: activin receptor like kinase, **LAP:** latency-associated peptide, **LTBP:** latent TGF- β binding protein, **SBE:** Smad binding elements, **HAT:** histone-acetyl transferase, **HDAC:** histone-deacetylase.

Modifiziert nach [Li et al. 2006]

1.7.2 Effekte von TGF- β auf das Immunsystem

Aus immunologischer Sicht ist TGF- β eines der wichtigsten regulatorischen Zytokine, die den Organismus vor überschießenden Reaktionen gegenüber harmlosen oder körpereigenen Substanzen schützen [Sakaguchi et al 2004]. In der frühen Phase einer Entzündung wirkt TGF- β pro-inflammatorisch und initiiert die Gewebereparatur, in der späteren Phase wirkt es jedoch anti-inflammatorisch und immunsuppressiv, da eine länger andauernde Entzündung für den Organismus schädlich ist [Luethviksson und Gunnlaugsdottir 2003].

Die wichtigsten Effekte von TGF- β auf Immunzellen sind:

- Proliferationshemmung durch Inhibition der IL-2 Produktion [Kehrl et al. 1986]
- Einschränkung der Entwicklung von CD4⁺-Zellen, d. h. weder Th₁- noch Th₂-Zellen bzw. deren Zytokine werden produziert
- Nachträgliches Hemmen des TGF-*signalings* durch früh produziertes IFN- γ , welches die Expression von Smad 7 fördert [Ulloa et al. 1999]
- Produktion des anti-inflammatorischen IL-10 und Unterbinden der Produktion von IL-12 [Geissmann et al. 1999]
- Inhibition der zytotoxischen Eigenschaften wie Produktion von Perforin, Granzyme oder IFN- γ durch CD8⁺-Zellen [Bellone et al. 1995]
- Induktion der Entwicklung von T_{regs}
- Unterbinden des Klassenwechsel zu IgG, stattdessen zu IgA [McIntyre et al. 1995]

1.7.3 Die Rolle von TGF- β in der Pathophysiologie von Tumoren

Tumore, die TGF- β produzieren oder umgebende Zellen zur TGF- β -Produktion anregen, sind in der Lage sich der Überwachung durch das Immunsystem zu entziehen. Im Anfangsstadium des Tumors hat TGF- β einen wachstumshemmenden Effekt auf die Tumorzelle. Durch verschiedene Mechanismen geht diese Ansprechbarkeit verloren. Diskutiert werden eine Mutation im TGF β RII sowie ein alternatives *signaling* über den Ras-*pathway*, der weniger stark wachstumshemmende Eigenschaften [Dernyck et al. 2001], sondern zum Teil sogar invasive Fähigkeiten vermittelt.

Die Induktion von T_{regs} durch TGF- β spielt eine wichtige Rolle beim Fortschreiten des Tumorwachstums [Nishikawa et al. 2005]. TGF- β vermindert außerdem MHC-II-Expression auf Tumorzellen, die so weniger immunogen sind.

1.8 Fragestellung

PDCs stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar und können mittels CpG-DNA zur Synthese von antitumoral wirksamem IFN- α stimuliert werden, welches nachfolgende Immunantworten induziert. Eine lokale CpG-Therapie wäre daher z. B. bei gut abgrenzbaren Kopf- und Halstumoren eine denkbare therapeutische Intervention. Hartmann et al. konnten in Vorarbeiten zeigen, dass PDCs in Tumorgewebe von Kopf- und Halstumoren infiltrierten, aber dort nur eine eingeschränkte Kapazität zur IFN- α -Produktion nach CpG-Stimulation aufwiesen [Hartmann et al. 2003]. Als einen möglichen Grund konnten sie eine Abnahme der Rezeptordichte von TLR 9 identifizieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob auch Mediatoren wie PGE₂ und TGF- β , die im Rahmen von Tumorerkrankungen vermehrt gebildet werden, eine ursächliche Rolle bei der Entstehung dieses beschriebenen Funktionsdefizits der tumorinfiltrierenden PDCs spielen.

Zunächst sollte die Wirkung von PGE₂ und TGF- β auf die Modulation der Zytokinsekretion, der Zellaktivierung sowie das Zellüberleben von PDCs bestimmt werden. Ferner galt es den Einfluss von PGE₂ auf die migratorische Kapazität der PDCs zu analysieren. Darüber hinaus sollte der den beobachteten Effekten zugrunde liegende molekulare Mechanismus untersucht und daran beteiligte Signaltransduktionswege identifiziert werden. Der Schwerpunkt der Arbeit lag diesbezüglich auf den Prostaglandin-vermittelten Effekten.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

2.1.1 Geräte

FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Lamin Air	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Brutschrank	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))
MiniMACS	Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach,D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Thermocycler Modell T3	Fa. Biometra (Göttingen, D)
UV FluoLink	Fa. Lourmat (Marne la Vallée, F)

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

11-deoxy-PGE ₁	Fa. Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Butaprost	Fa. Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
CD40L rekombinant	Fa. Apotech (Genf, CH)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
EDTA (kristallin)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
EDTA-Lösung 0,02%	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSClean/ FACSRinse	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Fluo-3	Fa. Molecular Probes (Eugene, USA)
Forskolin	Fa. Sigma-Aldrich, Fluka (Steinheim, D)
Fura Red	Fa. Molecular Probes (Eugene, USA)
Geneticin g-418 Sulfat	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
H-89	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Heparin-Natrium	Fa. Braun (Melsungen, D)
Indometacin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ionomycin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
0,9%ige Kochsalzlösung	Fa. Baxter (Höchstadt, D)
Loxoribine	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
PharM Lyse-Reagenz	Fa. BD PharMingen (Heidelberg, D)
Pluronic	Fa. Molecular Probes (Eugene, USA)
Paraformaldehyd (PFA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
PMA	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Prostaglandin E ₂	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
R848	Fa. InvivoGen (San Diego, USA)
SB-431542	Fa. Sigma –Aldrich (Steinheim, D)
Sulprostone	Fa. Sigma -Aldrich (Steinheim, D)

To-Pro-3-Jodid (Topro-3)	Fa. Molecular Probes (Eugene, USA), Invitrogen (Carlsbad, USA)
Transforming-growth factor β_1	Fa. Strathmann (Hamburg, D)
Trypanblau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Wasser f. Injektionszwecke	Fa. Braun (Melsungen, D)

2.1.3 Reagenziensätze

RNA-Isolation, cDNA-Synthese, PCR:

RNeasy® Mini Kit	Fa. Qiagen (Hilden, D)
ProtoScript® First Strand cDNA Kit	Fa. New England Biolabs (Frankfurt, D)
Taq DNA-Polymerase	Fa. Fermentas (St.Leon-Rot, D)
PCR Buffers	Fa. Fermentas (St.Leon-Rot, D)
PCR Marker N3234G	Fa. New England Biolabs (Frankfurt, D)

Zytokin-Bestimmung mittels ELISA/EIA:

IFN- α ELISA	Fa. BenderMed Systems (Wien, Österreich)
IL-6 ELISA	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
IL-8 ELISA	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
IL-12p40 ELISA	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
IL-12p70 ELISA	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
IL-10 ELISA	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
TNF- α ELISA	Fa. Biosource (San Diego, USA)
PGE ₂ EIA	Fa. Assay Designs (Ann Arbor, USA)
TGF- β_1 ELISA	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)

Zellisolation mittels MACS:

BDCA-4 Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
CD19 Beads	Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)

2.1.4 Materialien für die Zellkultur

RPMI 1640	Fa. Biochrom (Berlin, D)
humanes AB-Serum	Fa. BioWhittaker (Wakersville, USA)
fötales Kälberserum (FCS)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
humanes Serumalbumin (HSA)	Fa. Bayer (Leverkusen, 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 (<i>phosphate buffered saline</i>)	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)

2.1.5 Zytokine / Chemokine

SDF-1
Interleukin-3

Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)

2.1.6 Medien und Puffer für die Zellkultur und Gelektrophorese

RPMI-Vollmedium:
RPMI 1640-Medium
100 IU/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
1,5 mM L-Glutamin
10 Vol% fötales Kälberserum oder
2 Vol% autologes Serum oder
2 Vol% AB-Serum

MACS-Puffer:
2mM EDTA (kristallin)
0,5 Vol% BSA
pH 7,2 in PBS (steril)

TBE-Puffer:
89 mM TRIS-Borat
2 mM EDTA (kristallin)
pH 8,3 in Aqua dest.

10x binding Puffer:
0,1 M Hepes
1,4 M NaCl
25 mM CaCl₂

FACS-Puffer:
2 mM EDTA
1% FCS oder HSA
PBS

2.1.7 Antikörper gegen humane Oberflächenmoleküle und Zytokine

Bezeichnung	Spezifität	Klon	Fluoreszenz	Hersteller
Anti BDCA-2	BDCA-2	AC144	APC	Miltenyi Biotech
Anti CD123	CDw123	7G3	PE	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 1 (lin-1)	CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56	SK7	FITC	BD/ Pharmingen
Anti CXCR4	CXCR4		PE	R&D Systems
Anti CD154	CD154		FITC	BD/ Pharmingen
Anti CCR7	CCR7	3D12	APC	Prof. Förster (gift)
Annexin-V	Phosphatidylserin		FITC	BD/ Pharmingen

Der anti-CCR7 Antikörper ist an Biotin gekoppelt und benötigt eine zweite Konjugation mit Streptavidin-APC.

2.1.8 Oligodesoxynukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit benutzten ODN wurden teilweise freundlicherweise von der Fa. Coley Pharmaceuticals (Wellesley, USA) zur Verfügung gestellt bzw. bei der Fa. Metabion (Martinsried, D) bestellt.

Die Präparation der hochkonzentrierten Vorratslösung erfolgt in TE-Puffer mit einer definierten Konzentration von 1000 µg/ml. Weitere Verdünnungsschritte werden mit PBS durchgeführt, die Lagerung der Aliquots erfolgt bei -20°C. Die Konzentration der eingesetzten ODN in dieser Arbeit beträgt 3 µg/ml, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt. Vor dem Einsatz in der Zellkultur wurden alle ODN auf die Abwesenheit von Endotoxin getestet. Eine sensitive Methode ist die intrazelluläre Bestimmung von TNF- α in Monozyten. Diese Zellpopulation reagiert bereits auf kleinste Mengen Endotoxin.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' ->3')
ODN 2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
ODN 2216	GG <u>gggacgacgcgc</u> GGGGGg
ODN M362	TCGTC <u>CGTCGTT</u> CGAACGACGTTGAT

Tabelle 3 **Verwendete Oligodesoxynukleotide**

Palindrome sind unterstrichen. Großbuchstaben kennzeichnen Phosphorothioat-Bindungen, kleine Buchstaben Phosphodiester-Bindungen.

2.2 Immunologische Methoden

2.2.1 Zellisolation

Die in dieser Arbeit untersuchte Zellpopulation der plasmazytoiden dendritischen Zellen wurde ausschliesslich unter sterilen Bedingungen aus dem Spenderblut gesunder Probanden gewonnen. Hierzu wurde den Spendern in der Regel ein Blutvolumen von 100 - 200 ml Vollblut abgenommen, das sofort heparinisiert wurde.

Das der Isolation von PDCs zugrunde liegende Prinzip ist eine Dichtezentrifugation, bei der mittels Ficoll periphere mononukleäre Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) gewonnen werden. Die Isolation erfolgte über ein Leukosept-Röhrchen, das mit ca. 15 ml Raumtemperatur warmem Ficoll gefüllt war. Über der Ficoll-Schicht befand sich eine Trennschicht aus Schaumgummi, die die zu isolierenden Zellen zuverlässig vor dem zytotoxischen Ficoll schützte. Auf diese Schaumgummischicht wurden vorsichtig 25 ml Blut gegeben und zentrifugiert (1900 rpm, 15 min, 20°C, Beschleunigung 1, Bremse 1). Nach der Zentrifugation befand sich unterhalb des Schaumgummis ein Gemisch aus Ficoll und Erythrozyten. In dem darüber befindlichen Plasma hat sich durch die Zentrifugation ein Ring aus mononukleären Zellen gebildet. Dieser Ring wurde vorsichtig abgenommen und in neue, sterile Röhrchen (*blue caps*) überführt. Zum Verdünnen wurde mit isotonischer NaCl-Lösung auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Eine erneute Zentrifugation (1600 rpm, 15 min, 20°C, Beschleunigung 1 und Bremse 1) ließ alle mononukleären Zellen als ein Zellpellet auf dem Boden der *blue caps* erkennen. Diese Pellets wurden vorsichtig resuspendiert und in ein neues *blue cap gepoolt*. Die nächste Zentrifugation (1000 rpm, 10 min, 20°C, Beschleunigung 6 und Bremse 6) führte zur Abtrennung der Thrombozyten. Die so erhaltene Zellpopulation wurde mit Erylysepuffer behandelt. Dazu wurden die Zellen für 5 Minuten in 5 ml Erylysepuffer resuspendiert und bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde mit 15 ml NaCl gewaschen und die Zellen in 20 ml NaCl aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die PBMC mit Trypanblau im Verhältnis 1:20 verdünnt und in einer Neubauer-Kammer gezählt. Es wurden nur lebende, nicht blau erscheinende, Zellen berücksichtigt.

Die Isolation der PDCs erfolgte über eine Markierung mit Microbeads, die an BDCA-4 (Neuropilin-1) binden, ein Oberflächenmolekül, das ausschließlich von PDCs exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurde die PBMC Fraktion mit 50 µl/100 Mio. Zellen mit BDCA-4-Beads und FcR-Blocking-Reagenz versetzt. Resuspendiert wurde im dreifachen Volumen MACS-Puffer. Die Mischung wurde bei 4°C für 15 Minuten inkubiert und anschließend in MACS-Puffer gewaschen und resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde nun auf eine vorher mit MACS-Puffer befeuchtete LS-Säule aufgebracht, die sich in einem magnetischen Feld befand. Über paramagnetische Wechselwirkungen wurden nun nur die Zellen zurückgehalten, die mit Microbeads markiert waren. Ein zweimaliges Spülen mit 7 ml MACS-Puffer entfernte alle nicht markierten Zellen aus der Säule. Mit einem Stempel wurden nun die markierten Zellen aus der Säulematrix gepresst und in einem *blue cap* aufgefangen. Diese Art der

Isolation nennt man Positiv-Selektion. Im Gegensatz dazu bezeichnet die Negativ-Selektion den Ausschluss einer markierten Zellpopulation.

Zur weiteren Aufreinigung wurden diese *enriched* PDCs abzentrifugiert und in einem Volumen von 3 ml MACS-Puffer aufgenommen. Die Aufreinigung erfolgte auf der kleineren, feineren MS-Säule. Ein zweimaliges Spülen mit 1 ml MACS-Puffer erhöhte die Reinheit nochmals. Die in der Säule verbliebenen PDCs wurden auch hier mit einem Stempel durchgedrückt. Die so erhaltene Population wies eine Reinheit von im Mittel >95% auf.

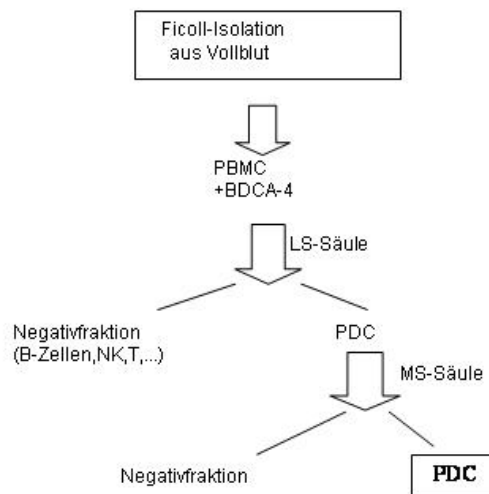


Abbildung 4 Schema der PDC-Isolation aus Vollblut

Die Isolation von PDCs ist ein relativ kritisches Verfahren, weil es sich um eine sehr empfindliche und selten vorkommende Subpopulation handelt. Die Isolation sollte möglichst zügig durchgeführt und Wartezeiten auf Eis überbrückt werden.

2.2.2 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Sämtliche Experimente fanden unter sterilen Bedingungen und Laminar-air flow statt. Zur Kultivierung von PDCs wurde RPMI-Medium mit einem 2%-igen Zusatz von autologem Serum verwendet. Dieses wurde mittels eines Serumröhrchens (enthält Silica-Partikel, die durch die Erhöhung der Oberfläche die Gerinnung beschleunigen) vom jeweiligen Spender gewonnen. Die

Zentrifugation (3000 rpm, 20°C, 10 min) sorgte für die Abtrennung von Erythrozyten. Das so erhaltene Serum wurde für mindestens 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert. Wenn nicht anders angegeben erfolgte in der Kultur außerdem immer ein Zusatz von 10 ng/ml IL-3, dem notwendigen Wachstumszytokin für die PDC. Wenn nichts anderes angegeben ist, wurden jeweils 25.000 PDC/200µl in einer 96-well Rundbodenplatte kultiviert. Die mit „Medium“ in den Abbildungen beschrifteten Balken zeigen (je nach Legende) CpG- oder nicht CpG-stimulierte PDCs in Medium.

2.2.3 Kultivierung von Zelllinien

2.2.3.1 CD40-Ligand-Zelllinie

Bei den verwendeten CD40L-tragenden Zelllinien handelt es sich um transfizierte *baby hamster kidney* (BHK) Zellen. Die Kontrollzelllinie ist mit demselben Plasmid transfiziert, allerdings ohne das CD40L cDNA-Insert und ist Neomycin-resistent. Beide Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Engelmann (Universität München) zur Verfügung gestellt und wurden regelmäßig auf Mykoplasmen getestet. Die Kultivierung erfolgte in 20 ml Kulturflaschen mit 10 ml RPMI-Vollmedium unter dem Zusatz von 10% FCS. Die Zelllinien wurden regelmäßig gesplittet und standen permanent unter dem Selektionsdruck von 200 µg/ml G418. Um weitere Zellteilungen zu verhindern, wurden die BHK-Zellen vor dem Einsatz in der Zellkultur mit 0,7 J/cm² UV-Strahlen inaktiviert.

Bei der LTK-Zelllinie handelt es sich um eine Maus-Fibroblasten-Zelllinie, die mit einem Expressionsvektor für den humanen CD40-Liganden stabil transfiziert wurde. Sie wurde freundlicherweise von Martin Schlee (GSF, München) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte mit 10% FCS-Medium in 10 ml Kulturflaschen, ohne Selektionsdruck.

Beide Zelllinien wurden in der Zellkultur im Verhältnis 1:5 eingesetzt.

2.2.3.2 FADU- und PCI-Zelllinie

Die beiden HNO-Karzinomzelllinien wurden freundlicherweise von Olivier Gires (HNO-Klinik Großhadern, München) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung fand in 20 ml Kulturflaschen mit 10% FCS RPMI-Medium statt. Die Abnahme der Überstände erfolgte nach 48 Stunden Kultivierung. Teilweise wurden die Zelllinien mit dem COX-Inhibitor Indometacin behandelt. Diese Behandlung erfolgte in der Konzentration von 1 μM Indometacin über 48 Stunden Kultivierung im Brutschrank. Die Überstände der Zelllinien wurden in der Zellkultur im Verhältnis 1:1 eingesetzt.

2.2.4 Migrationsassay

Zur Untersuchung der Migration von PDCs auf das Chemokin SDF-1 wurde ein *transwell assay* durchgeführt. 50.000 frisch isolierte PDCs wurden in einem Volumen von 150 μl mit 1% AB-Medium und mit oder ohne 50 μl 1 μM PGE₂ über zwei Stunden im Brutschrank präinkubiert. Es erfolgte weder eine Zugabe von IL-3 noch von CpG-DNA. Danach wurden die Zellen in *transwell*-Einsätze eingebracht, in deren unteren Kompartimenten sich 600 μl AB-Medium und das Chemokin SDF-1 (100 ng/ml) befanden. Die Migration erfolgte im Brutschrank innerhalb von zwei Stunden durch eine Polycarbonatmembran mit der Porengröße 0,5 μm (Fa. Corning, USA). Per Mikroskop wurden die migrierten Zellen ausgezählt.

2.2.5 Durchflusszytometrie

2.2.5.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie mittels eines *fluorescence-activated-cell-sorters* (FACS) bietet die Möglichkeit - im Gegensatz zur klassischen Mikroskopie - mehrere optische Eigenschaften von Zellen mit hoher Durchsatzrate zu analysieren. Die Messgeschwindigkeit des verwendeten BD FACSCalibur® beträgt 4000 Zellen pro Sekunde, in der vorliegenden Arbeit wurden max. 400 Zellen pro Sekunde gemessen. Bestimmbare Parameter sind unter anderem die relative Größe, Granularität und die Identifizierung bestimmter Oberflächenmoleküle. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit einem an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper gegen ein bestimmtes Oberflächenantigen markiert und über einen laminaren Probenstrom

einzel von einem Laser erfasst. Aufgrund der Beschaffenheit einer Zelle (Größe, Granularität) wird der Laserstrahl in einer bestimmten Art und Weise gebeugt bzw. gebrochen. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) entspricht der Lichtbeugung, ist proportional zur Zellgröße und wird entlang der Achse des einfallenden Lichtes gemessen. Das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) entspricht hingegen der Lichtbrechung und Reflexion und gibt Informationen über die Zellkomplexität oder – granularität. Es wird im 90°-Winkel zum einfallenden Licht gemessen. Diese beiden Parameter dienen dazu eine bestimmte Zellpopulation auszuwählen und sie anhand spezifischerer Fluoreszenzeigenschaften näher zu charakterisieren. Beim hier verwendeten BD FACSCalibur® können bis zu vier verschiedene Farbstoffe über zwei Laser vermessen werden. Das Fluorochrom des verwendeten Farbstoffs adsorbiert die Energie des Laserlichtes und gibt die absorbierte Energie in Form von Photonen größerer Wellenlänge (=geringerer Energie) wieder frei. Die entstandene Fluoreszenz ist proportional zur Anzahl der gebundenen Fluorochrommoleküle und gibt somit Aufschluss über die untersuchten Oberflächenmarker. Als Kriterium der Rezeptordichte wird die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity* = MFI) herangezogen. Die gleichzeitige Bestimmung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe führt häufig zu spektralen Überlappungen benachbarter Detektoren, die über die sogenannte „Kompensation“ so gering wie möglich gehalten werden muss, da es sonst zu falsch positiven Signalen kommt.

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

Tabelle 4 Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

2.2.5.2 Reinheit der plasmazytoiden dendritischen Zelle

Zur durchflußzytometrischen Identifizierung von Oberflächenantigenen wurden 10^5 Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert (1300 rpm, 6 min, Beschleunigung 6, Bremse 6) und in 50 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die fluoreszenzmarkierten Antikörper (1-1,5 µl pro Farbstoff) wurden für fünf Minuten unter

Lichtausschluss bei Raumtemperatur mit den Zellen inkubiert. Danach wurde mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

PDCs wurden als lineage⁻, CD123^{high}, HLA-DR⁺⁺⁺ und CD11c⁻ identifiziert.

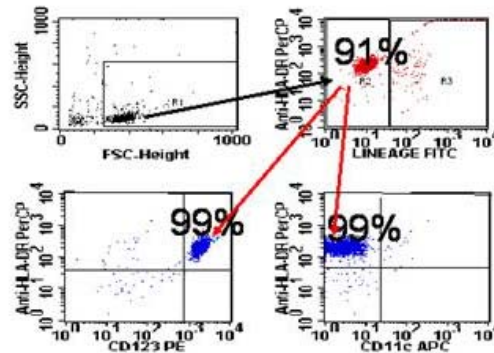


Abbildung 5 FACS-Analyse der Reinheit isolierter PDCs

2.2.5.3 Annexin-Färbung zum Ausschluss apoptotischer Zellen

Um zu zeigen, dass weder PGE₂ noch TGF-β in den verwendeten Konzentrationen Apoptose in PDCs auslösen, wurde eine Annexin-V-Färbung durchgeführt. Phosphatidylserin (PS) findet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran lebender Zellen. Während der Apoptose transloziert PS auf die Außenseite der Membran. Dort kann es von Annexin-V gebunden werden. Annexin-V ist ein Ca²⁺-abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität für PS. Durch diese Markierung von Annexin-V-FITC an PS kann man apoptotische Zellen durchflusszytometrisch identifizieren.

Für die Messung wurden 35.000 PDCs gewaschen, in FACS-Puffer resuspendiert und mit CD123 PE und HLA-DR PerCp gefärbt. Danach wurde mit reinem PBS gewaschen. Die Resuspendierung erfolgte in einfach *binding buffer* (50 µl für 100.000 Zellen) danach die Markierung mit 2 µl Annexin-V-FITC. Die zwanzigminütige Inkubation fand unter Lichtausschluss statt. Danach wurde gewaschen und in *binding buffer* zu einem Endvolumen von 200 µl resuspendiert. Zum Schluss wurde noch Topro-3 (4 µl/200 µl) kurz vor der FACS-Messung zugegeben. Die Messung musste innerhalb einer Stunde nach Färbung erfolgen. Topro-3 (früher Molecular Probes, jetzt Invitrogen) ist ein

Farbstoff auf Carbocyanin-Basis, der ausschließlich Nuklei toter Zellen anfärbt, da lebende Zellen für den Farbstoff nicht permeabel sind.

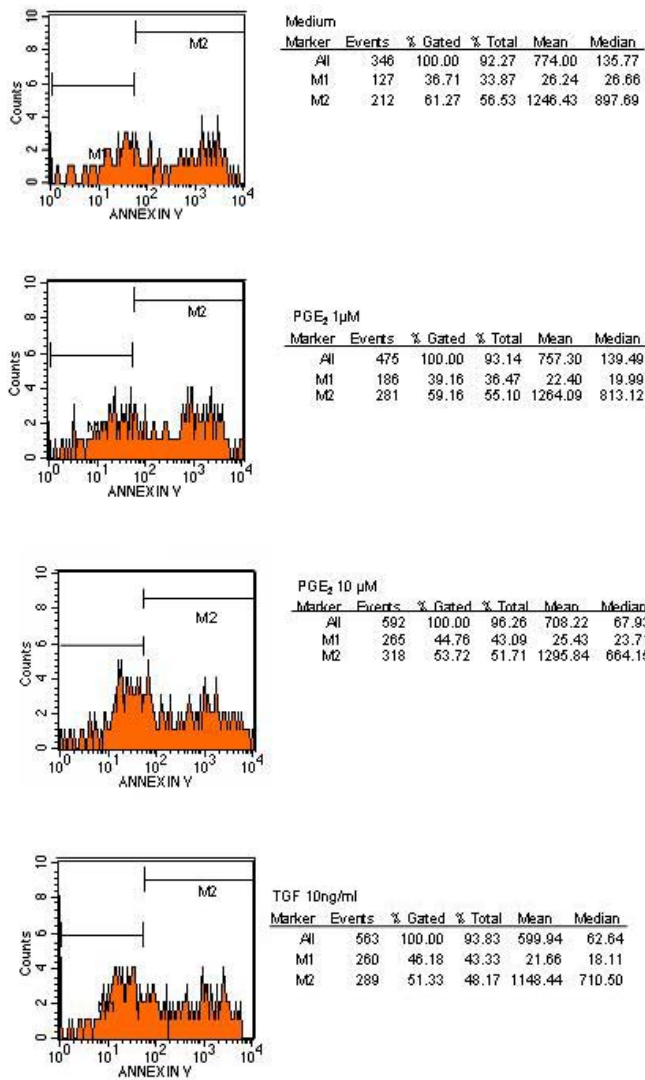


Tabelle 5 Annexin-Färbung zum Ausschluss apoptotischer Zellen

35.000 PDCs werden mit PGE₂ und TGF-β über 4 Stunden präinkubiert und mit CpG-B 2006 stimuliert. Die Färbung erfolgt mit Annexin-V-FITC, CD123 PE, HLA-DR PerCp und Topro-3.

2.2.5.4 Intrazelluläre Calcium-Messung

Die Änderungen intrazellulärer Calcium-Konzentrationen werden mit Hilfe Ca^{2+} -sensitiver Farbstoffe detektiert. Diese Farbstoffe ändern ihre Fluoreszenzeigenschaften bei der Bindung von Ca^{2+} . In dieser Arbeit wurden zwei Farbstoffe verwendet, die gegenläufig auf Ca^{2+} reagieren und Fluoreszenzlicht bei deutlich unterschiedlichen Wellenlängen emittieren. Es handelt sich um Fluo-3-AM und FuraRed. Beide Farbstoffe liegen als membrangängige Acetoxymethylester vor und gelangen so in die Zelle. Intrazellulär spalten Esterasen die Acetoxymethyl-Gruppe ab, wodurch der Farbstoff in der Zelle kumuliert. Die beiden Farbstoffe wurden mit Hilfe des Lösungsvermittlers Pluronic mit 100.000 PDCs im Brutschrank für 45 Minuten inkubiert. Folgende Konzentrationen wurden eingesetzt:

- FuraRed : 10 μg /ml
- Fluo-3 : 4 μg /ml
- Pluronic detergent : 0,02 % Endkonzentration

Danach wurde gewaschen und die Zellen unter Lichtabschluss per FACS vermessen. FuraRed reagiert auf eine Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität, während dies bei Fluo-3 zu einer Fluoreszenzzunahme führt. Die Ratio aus diesen beiden Werten ergibt die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Als Positivkontrolle und Maximal-Stimulus diente Ionomycin in einer Konzentration von 1 μg /ml. Ionomycin ist ein Calciumionophor, das durch die Ausbildung calciumselektiver Poren den Einstrom von Calcium aus dem Extrazellularraum und den intrazellulären Speichern in das Zytosol vermittelt.

2.2.6 Zytokinquantifizierung per ELISA

Die Quantifizierung von im Überstand enthaltenen Zytokinen erfolgte per ELISA. Bei dieser sehr schnell durchzuführenden und ausreichend sensitiven Methode, bedient man sich eines Enzyms als Marker für die enthaltene Konzentration an bestimmten Zytokinen. Exemplarisch wird hier die Bestimmung von IFN- α in Kulturüberständen beschrieben.

Im ersten Schritt wurden die Platten über Nacht mit einem Erstantikörper beschichtet. Dieser wurde am nächsten Morgen abgewaschen und restliche freie Proteinbindungsstellen mit BSA-enthaltenem PBS für zwei Stunden abgeblockt. Die abgenommenen Kulturüberstände wurden adäquat mit Probenpuffer verdünnt und aufgetragen. Eine ebenfalls aufgetragene Standardreihe enthielt definierte Konzentrationen des zu bestimmenden Zytokins. Zeitgleich wurde Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase* = HRP) hinzu gegeben, die das zu bestimmende Protein an einem anderen Epitop bindet. In der folgenden zweistündigen Inkubation erfolgte eine Adsorption des Proteins an den Erstantikörper und eine Konjugation an das HRP-Enzym. Nach drei Waschschritten fügte man Substrat hinzu, hier 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Die colorimetrische Reaktion muss durch Schwefelsäure (2N) gestoppt werden, danach misst man das bis zu diesem Zeitpunkt gebildete Produkt mit einem ELISA-Reader. Die Farbintensität des Produktes ist proportional zur in der Probe enthaltenen Proteinmenge und kann über die Standardreihe genau bestimmt werden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Extraktion zytoplasmatischer RNA

Zur Extraktion zytoplasmatischer RNA aus PDCs wurde das RNeasy® Mini Kit von Qiagen verwendet. Dabei wurden bis zu 5×10^6 PDCs in 350 μ l Lysepuffer aufgenommen und homogenisiert, um Zellaggregate zu zerstören, die Viskosität der Lysate zu vermindern und RNasen zu zerstören. Danach wurde das gleiche Volumen an 70%-igem Ethanol hinzugegeben, um eine optimale Bindung an die Silicagel-Säule zu ermöglichen. Das Gemisch wurde nun auf diese Silicagel-Säule aufgebracht. Dann wurde 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert. Da nur Nukleinsäuren in der Säule hängen bleiben, wurde der Durchfluß verworfen. Nachfolgend wurde die möglicherweise noch vorhandene DNA mit 70 μ l DNase (Qiagen) für 15 Minuten bei RT verdaut. Um die verdaute DNA sowie DNase zu entfernen, wurde mit jeweils 500 μ l zwei verschiedener Waschpuffer je 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert. Abschließend wurde nochmals mit 500 μ l Waschpuffer für zwei Minuten bei 8000g zentrifugiert. Um die RNA zu eluieren wurden 30 μ l RNA-freies Wasser auf die Säule gegeben, es folgte eine einminütige Zentrifugation bei 8000g. Die so erhaltene RNA wurde bei -20°C gelagert.

2.3.2 Reverse Transkription und cDNA-Synthese

Um in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden zu können, musste die gewonnene RNA revers transkribiert und in *copy*-DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu wurde das ProtoScript® First Strand cDNA Synthese Kit von New England Biolabs verwendet. Hierbei wurden zwischen 1 ng-2 µg RNA (1-10 µl) mit 2 µl dT₂₃ Primer (50 µM) und 4 µl eines dNTP Mixes (2,5 mM) ggf. mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 16 µl aufgefüllt und für fünf Minuten bei 70°C erhitzt. Nachfolgend wurde der Reaktionsansatz mit 2 µl 10xReaktionspuffer, 1 µl RNase Inhibitor (2 U/µl) und 1 µl Reverser Transkriptase (25 U/µl) versetzt und bei 42°C eine Stunde inkubiert. Abschließend folgte eine fünfminütige Inaktivierung des Enzyms bei 95°C. Der Ansatz kann zu einem Endvolumen von 50 µl mit destilliertem Wasser verdünnt werden und die so erhaltene cDNA als Ausgangsmatrize für eine PCR dienen.

2.3.3 Polymerasekettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion bedient man sich eines Verfahrens, das vorliegende DNA über mehrere Zyklen mit Hilfe eines Enzyms vervielfältigen kann. Das zu amplifizierende DNA-Stück wird als *template* bezeichnet. Eine Standard-PCR kann bis zu 3000 Basenpaare lange DNA-Fragmente kopieren.

Folgende Komponenten benötigt man für eine PCR:

Original-DNA: enthält das zu amplifizierende Stück

zwei Primer: grenzen auf der Start-DNA das zu amplifizierende Fragment ein

Nukleotide: Bausteine für die neuen DNA-Stränge

DNA-Polymerase: synthetisiert den neuen DNA-Strang, Taq-Polymerase, thermostabil

Mg²⁺-Ionen: essentiell für die Funktion der Polymerase

Pufferlösungen: schafft optimales Milieu für die Polymerase

Der Ablauf einer PCR gliedert sich in mehrere Schritte, die in einem *Thermocycler* ablaufen. Das ist ein Gerät, bei dem man jede beliebige Temperatur sehr exakt und in zeitlicher Abfolge einstellen kann.

1. Denaturierung

Die doppelsträngige DNA wird bei 95°C aufgeschmolzen und trennt sich in zwei Einzelstränge. Zu Beginn des ersten Zyklusses wird länger auf 95°C erhitzt, um sicherzustellen, dass sich sämtliche Stränge bzw. *Primer* getrennt haben.

2. Annealing

Nach dem Auftrennen der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass sich die *Primer* an die Einzelstränge anlagern können. Die gewählte Temperatur ist abhängig vom Schmelzpunkt der *Primer* und liegt ca. zwischen 50 - 65 °C. Eine falsche Temperatur führt dazu, dass der *Primer* nicht (Temperatur zu hoch) oder an der falschen Stelle bzw. unspezifisch (Temperatur zu niedrig) bindet.

3. Elongation

Die Temperatur steigt auf 72°C, dem optimalen Arbeitsbereich der Taq-Polymerase. Die Polymerase synthetisiert nun ausgehend von den Primerpaaren den komplementären Strang.

Das so entstandene DNA-Fragment kann in darauffolgenden Schritten auch als Matrize verwendet werden. Es kommt so zu einer exponentiellen Vermehrung der entsprechenden Produkte. Die oben genannten Zyklen werden ca. dreißig Mal wiederholt, dann folgt eine abschließende zehnminütige Elongation, damit alle Produkte gebunden sind.

<u>Komponenten</u>	<u>Volumen (µl)</u>
10xBuffer (mit (NH ₄) ₂ SO ₄ , ohne MgCl)	2,5
MgCl	1,5
dNTP 10mM	0,5
<i>forward Primer</i> (1:10 in Aqua dest.)	1,25
<i>reverse Primer</i> (1:10 in Aqua dest.)	1,25
cDNA	5,0
Taq Polymerase	0,5
Aqua dest.	ad 25,0

Primer	Sequenz (5'→3')	Annealingtemp.
EP ₁ F	ATCTGCTGGAGGCCAATGCTGGTGT	65°C
EP ₁ R	TCGTTGGGCCTCTGGTTGTGCTT	
EP ₂ F	GCTGCTGCTTCTCATTGTCTCG	62°C
EP ₂ R	TCCGACAACAGAGGACTGAACG	
EP ₃ F	GGACTAGCTCTTCGCATAACTG	56°C
EP ₃ R	GCAGTGCTCAACTGATGTCTG	
EP ₄ F	GTCATCTTACTCATTGCCACC	56°C
EP ₄ R	CTCTATTGCTTTACTCAGCACTG	

Tabelle 6 **Verwendete Primer, deren Sequenz und die ermittelte optimale Annealingtemperatur**

F (forward) bezeichnet den Vorwärtsprimer, R (reverse) den Rückwärtsprimer, Metabion (Martinsried, D)

Standard-Programm für alle EP-Rezeptoren:

Denaturierung:	94°C	5min
Zyklus 30 x:	94°C	40s
	versch.	1min
	72°C	1min
Endelongation:	72°C	10min
Lagerung:	4°C	endlos

Die erwarteten Produktgrößen in Basenpaaren (bp):

EP₁: 309 bp
 EP₂: 392 bp
 EP₃: 293 bp
 EP₄: 216 bp

2.3.4 Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung der erhaltenen DNA-PCR-Produkte bedient man sich der Gelelektrophorese. Hierbei wird an ein Gel ein elektrisches Feld angelegt, das die geladenen Teilchen zur Wanderung anregt. Da DNA negativ geladen ist, wandert sie zur Anode. Das Prinzip der Größentrennung beruht darauf, dass kleine Teilchen schneller durch die Poren im Gel wandern können.

Hier wurde ein 1%-iges Agarosegel verwendet, wobei 1 g Agarose mit 100 ml 1xTBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht wurde. Nach dem Abkühlen und der Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid wurde die Mischung in einen Plexiglas-Gelschlitten gegossen und mit einem Kamm versehen. Dieser Kamm bildet Probenaschen im Gel. Das fertige, auspolymerisierte Gel wurde nun in eine Gelkammer eingebracht und mit ausreichend 1xTBE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden nun mit 4 µl 6xLadepuffer versehen und in die Geltaschen pipettiert. Der Ladepuffer enthält den Farbstoff Bromphenolblau, der es erlaubt, das Fortschreiten der Elektrophorese optisch abzuschätzen. Außerdem enthält er Glycerin, das aufgrund der höheren Dichte als Wasser das Absinken der Proben in die Geltaschen erleichtert. Zusätzlich benötigte man noch einen Marker, der eine Mischung verschieden großer DNA-Fragmente enthält. Danach wurde eine elektrische Spannung von 100 Volt angelegt. Sind die Fragmente ausreichend aufgetrennt, wird das Gel unter UV-Licht betrachtet. Da das verwendete Ethidiumbromid in die DNA interkaliert hat, kann man die Auftrennung optisch wahrnehmen. Durch Vergleich der Laufhöhen von Proben und Marker kann man auf die Länge der Proben-DNA-Stränge schließen. Die Dokumentation erfolgte per Digitalkamera unter UV-Licht.

2.4 Statistische Analyse

Bei multiplen Versuchen sind die Ergebnisse als arithmetisches Mittel angegeben, die Streuung der Werte um den Mittelwert wurde über die Mittelabweichung bestimmt. Um die statistische Signifikanz einzelner Untersuchungsergebnisse zu bestimmen, wurde der zweiseitige Student-t-Test für paarige Stichproben angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten $< 0,05$ angenommen und mit * gekennzeichnet, bei p-Werten $< 0,005$ diente zur Kennzeichnung **.

2.5 Software

- Die Ergebnisse der FACS-Analysen wurden mit dem Programm *CellQuest 4.0* (BD Pharmingen, D) ausgewertet.
- Die rechnerische Auswertung sowie die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Programme *Microsoft Excel* und *Microsoft PowerPoint* (Microsoft Corporation, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Überstände der Zelllinien FADU und PCI inhibieren die IFN- α Produktion

Hartmann et al. [Hartmann et al. 2003] konnten zeigen, dass plasmazytoide dendritische Zellen in Tumorgewebe von Kopf- und Halstumoren infiltrieren können, ihre Stimulierbarkeit jedoch im Tumorgewebe vermindert ist. Dadurch ist die Produktion von IFN- α durch diese PDCs eingeschränkt. Da in der betreffenden Arbeit die PDCs mit CpG-DNA stimuliert wurden, konnte letzterer Befund zumindest teilweise durch eine verminderte Expression von Toll-like Rezeptor 9 erklärt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die weiterführende Frage bearbeitet, ob zusätzlich zur verminderten TLR 9-Expression auch von Tumoren freigesetzte Mediatoren zu der reduzierten IFN- α -Produktion beitragen könnten.

Zu diesem Zweck wurden zunächst PDCs mit Zellkulturüberständen von Kopf- und Halstumoren präinkubiert und anschließend mit CpG-DNA stimuliert. Für das in Abbildung 6 gezeigte Experiment wurden die Zelllinien FADU und PCI verwendet, da von diesen Zelllinien bereits bekannt war, dass sie Prostaglandin E₂ sezernieren können. Dies konnte in der ELISA-Analyse des Zellkulturüberstandes bestätigt werden. Der PGE₂-Gehalt der FADU-Zelllinie betrug zum Untersuchungszeitpunkt 40 pg/ml, dies entspricht 113 picomolar; die PCI-Zelllinie wies einen Gehalt von 1470 pg/ml auf, entsprechend 4 nanomolar. IL-10 und TGF- β konnten in den Überständen nicht detektiert werden.

In Vorversuchen zeigte sich, dass eine Präinkubation mit PGE₂ über vier Stunden die maximale Inhibition der IFN- α -Produktion bedingte. Wie in Abbildung 6 dargestellt, führte die Präinkubation der PDCs mit den auf den PGE₂-Gehalt untersuchten Tumorzelllinienüberständen der FADU- bzw. PCI-Zelllinie zu einer Abnahme der IFN- α -Produktion nach CpG-Stimulation.

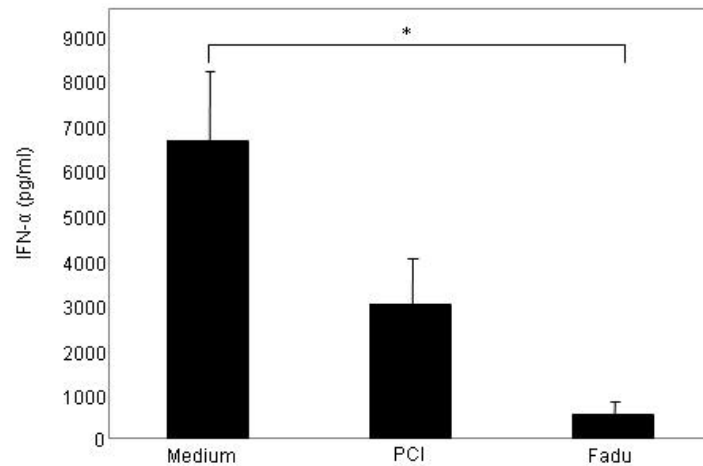


Abbildung 6 Überstände der FADU- und PCI-Zelllinie hemmen die IFN- α Produktion in PDCs

PDCs (25.000/100 μ l) wurden mit jeweils 100 μ l Überstand der jeweiligen Zelllinie inkubiert. Auf eine vierstündige Präinkubation folgte eine 24-stündige Stimulation mit ODN 2216. Die Überstände wurden per ELISA auf ihren IFN- α Gehalt untersucht. Das Diagramm zeigt ein Experiment mit 3 Spendern und der dazugehörigen Mittelabweichung.

Zusätzlich zu diesen Experimenten wurden Überstände von primären Kopf- und Halstumoren, die freundlicherweise von der Universitätsklinik Lübeck (Prof. B. Wollenberg) zur Verfügung gestellt wurden, auf den Gehalt von PGE₂, TGF- β und IL-10 untersucht. Diese Überstände wiesen bereits nach 12 Stunden Inkubation in Medium sowohl hohe PGE₂- als auch IL-10-Spiegel auf. Die Freisetzung von TGF- β erfolgte nach 48 Stunden Inkubation. Eine Inkubation von PBMC mit diesen Tumorüberständen zeigte, wie erwartet, eine starke Reduktion der IFN- α -Freisetzung (Daten nicht gezeigt).

3.2 Einfluss des COX-Inhibitors Indometacin

Um die Rolle des tumorsezernierten PGE₂ besser zu definieren zu können, wurde im folgenden Experiment die PGE₂-Sekretion der Tumorzelllinien durch eine COX-Hemmung inhibiert. Das nicht-steroidale Antirheumatikum Indometacin hemmt reversibel die COX-1/2 und somit die Produktion von PGE₂.

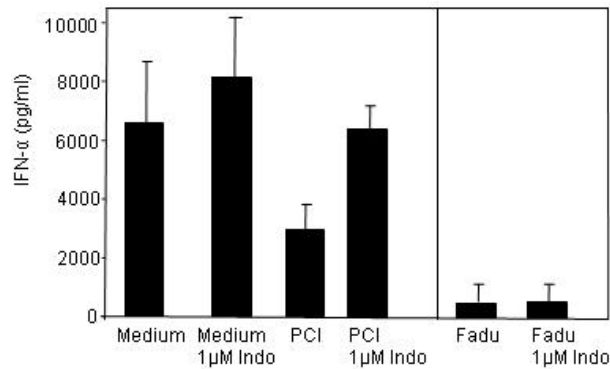


Abbildung 7 Indometacin kann den PGE₂-inhibitorischen Effekt antagonisieren

PDCs (25.000/100µl) wurden jeweils mit den Überständen von mit und ohne Indometacin behandelten Tumorüberständen (100µl) für vier Stunden präinkubiert und dann mit ODN 2216 für 24 Stunden stimuliert. Die Überstände wurden per ELISA auf ihren IFN-α Gehalt untersucht. Das Diagramm zeigt unabhängige Versuche mit drei Spendern und der dazugehörigen Mittelabweichung.

Mit Indometacin inkubierte Überstände der Zelllinie PCI zeigten einen deutlichen Anstieg der IFN-α-Produktion. Der COX-Einfluss auf Überstände der FADU-Zelllinie war nur beschränkt. Die Untersuchung des im Kulturüberstand enthaltenen PGE₂ zeigte, dass Indometacin in der PCI-Zelllinie die PGE₂-Produktion inhibierte.

Bezeichnung	PGE ₂ (pg/ml)
PCI	1470
PCI 1µM Indo	76
FADU	39
FADU 1µM Indo	34

Tabelle 7 PGE₂-Gehalt der PCI- und FADU- Zelllinie

Interessanterweise wurden bei der Inkubation von PDCs mit den Indometacin-Kontrollen (Indometacin 1 µM über 48 Stunden im Inkubator, keine Zelllinie) höhere IFN-α-Werte als mit CpG-stimulierten PDCs alleine gemessen. Dies konnte ein Hinweis darauf sein, dass die PDC autokrin PGE₂ produzieren kann. Eine daraufhin durchgeführte mRNA-Analyse (T. Giese, Heidelberg) bestätigte die Existenz von COX-2 in der PDC und unterstützt somit diese Vermutung. Auch wiesen Überstände von 100.000 unstimulierten PDCs eine PGE₂-Sekretion von 56 pg/ml auf, während in CpG-B-stimulierten PDCs ein gesteigerter PGE₂-Spiegel von 86 pg/ml messbar war.

Ergänzend wurden vier weitere HNO-Karzinomzelllinien (Universitätsklinikum Lübeck, Prof. B. Wollenberg) untersucht, die mit und ohne Acetylsalicylsäure (ASS) vorbehandelt worden waren (Tabelle 8). Die Analyse der Überstände mittels PGE₂-ELISA zeigte ebenfalls eine verminderte Produktion von PGE₂ bei den ASS-behandelten Zelllinien.

Zelllinie	PGE ₂ (pg/ml)		TGF-β ₁ (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
	ohne ASS ²	mit ASS		
BHY	2970	2084	483	0
HLAG79	23	19	0	0
FADU	13	11	0	0
PCI-13	156	33	0	17
Ant-1	2	11	0	0
PCI-1	181	94	0	0

Tabelle 8 Gehalt an PGE₂, TGF-β₁ und IL-10 verschiedener Zelllinien

3.3 Einfluss von PGE₂ und TGF-β auf die Zytokin-Produktion

Da aufgrund der in 3.1 gezeigten Ergebnisse anzunehmen war, dass tumorsezerniertes PGE₂ die IFN-α-Produktion von PDCs gezielt hemmen kann, sollte diese Beobachtung mittels rekombinantem humanem PGE₂ bestätigt werden. Zusätzlich wurde der Einfluss von rekombinantem humanem TGF-β bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte, dass sowohl rekombinantes PGE₂ als auch rekombinantes TGF-β die Produktion von IFN-α hemmten. Vor allem aber führte die Kombination beider Substanzen zu einer fast vollständigen Blockade der IFN-α-Freisetzung (Abbildung 8). Das Tumormilieu wirkt demnach der IFN-α-Produktion entgegen, und schützt somit den Tumor vor den immunstimulierenden Effekten dieses Zytokins.

Da die PDC zusätzlich zur Typ-I IFN-Produktion auch andere proinflammatorische Zytokine produzieren kann, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die PGE₂- und TGF-β-vermittelte Hemmung auch andere Zytokine betrifft. Abbildung 9 veranschaulicht, dass sowohl PGE₂ als auch TGF-β die Produktion von TNF-α hemmten.

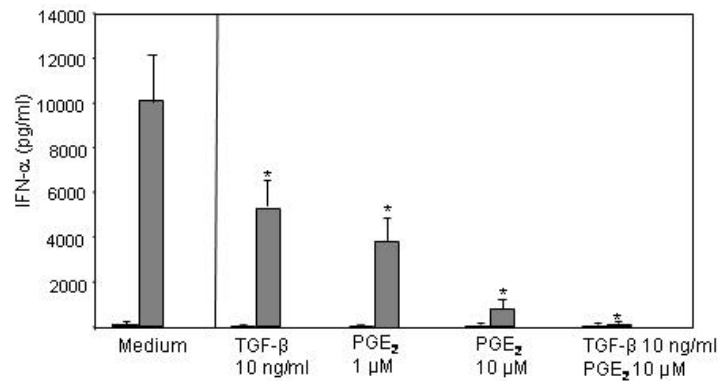


Abbildung 8 PGE₂ und TGF-β hemmen die IFN-α-Freisetzung in PDCs

PDCs (25.000/200μl) wurden für vier Stunden mit 1 μM bzw. 10 μM PGE₂ bzw. 10 ng/ml TGF-β präinkubiert. Danach folgte eine Stimulation mit CpG-B 2006 über 24 Stunden. Die Konzentration von IFN-α in den Überständen wurde per ELISA bestimmt. Graue Balken zeigen die CpG-stimulierten Bedingungen, schwarze Balken die unstimulierten Kontrollen. Das Diagramm zeigt unabhängige Versuche von 5 Spendern mit dazugehöriger Mittelabweichung (* = p < 0,05 gegenüber der stimulierten Bedingung).

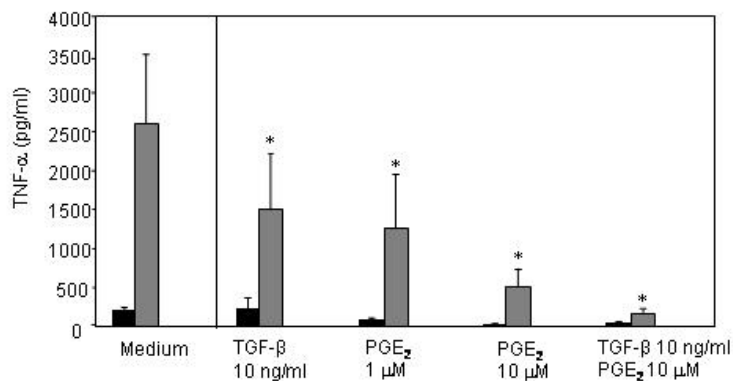


Abbildung 9 PGE₂ und TGF-β hemmen die TNF-α-Freisetzung in PDCs

PDCs (25.000/200μl) wurden für vier Stunden mit 1 μM bzw. 10 μM PGE₂ bzw. 10 ng/ml TGF-β präinkubiert. Danach folgte eine Stimulation mit ODN 2006 über 24 Stunden. Die Konzentration von TNF-α in den Überständen wurde per ELISA bestimmt. Graue Balken zeigen die CpG-stimulierten Bedingungen, schwarze Balken die unstimulierten Kontrollen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus vier Experimenten mit der dazugehörigen Mittelabweichung (* = p < 0,05 gegenüber der stimulierten Bedingung).

Im Gegensatz hierzu zeigten weitere Experimente, dass PGE₂ – anders als TGF-β – die IL-6 und IL-8-Produktion verstärken konnte. Ein Anstieg des IL-6 und IL-8 war auch in nicht CpG-DNA-stimulierten PDCs zu beobachten (Abbildung 10), wurde jedoch durch CpG-Stimulation noch verstärkt.

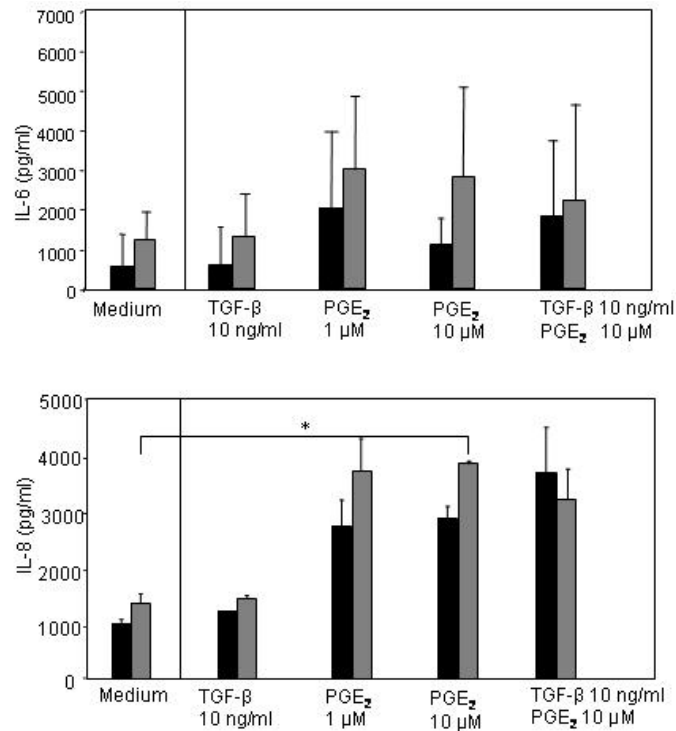


Abbildung 10 PGE₂ induziert IL-6 und IL-8 in PDCs

PDCs (25.000/200 μ l) wurden für vier Stunden mit 1 μ M bzw. 10 μ M PGE₂ bzw. 10 ng/ml TGF- β bzw. der Kombination aus beiden Faktoren präinkubiert. Danach folgte eine Stimulation mit ODN 2006 über 24 Stunden. Die Konzentrationen von IL-6 und IL-8 in den Überständen wurde mittels ELISA bestimmt. Graue Balken zeigen die CpG-stimulierten Bedingungen, schwarze Balken die unstimulierten Kontrollen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus vier Experimenten mit der dazugehörigen Mittelabweichung.

3.4 Suppression der IFN- α Antwort auch nach TLR 7-Stimulation durch PGE₂

Da die PDC neben TLR 9 auch TLR 7 exprimiert, wurden in dem unten dargestellten Experiment die synthetischen TLR 7-Agonisten Loxoribine und R848 verwendet [Heil et al. 2003], um die Frage zu klären, ob PGE₂ und TGF- β spezifisch die CpG-induzierte IFN- α -Produktion hemmen oder ob diese Hemmung auch bei Stimulation mit anderen TLR-Stimuli zu beobachten ist. Die Ergebnisse zeigten, dass die Reduktion der IFN- α -Freisetzung durch PGE₂ und TGF- β auch nach Stimulation mit TLR 7-Agonisten zu beobachten ist. Diese Reduktion war nach Stimulation mit Loxoribine deutlicher zu erkennen. Dies kann möglicherweise auf eine suboptimal gewählte R848-Konzentration zurückzuführen sein.

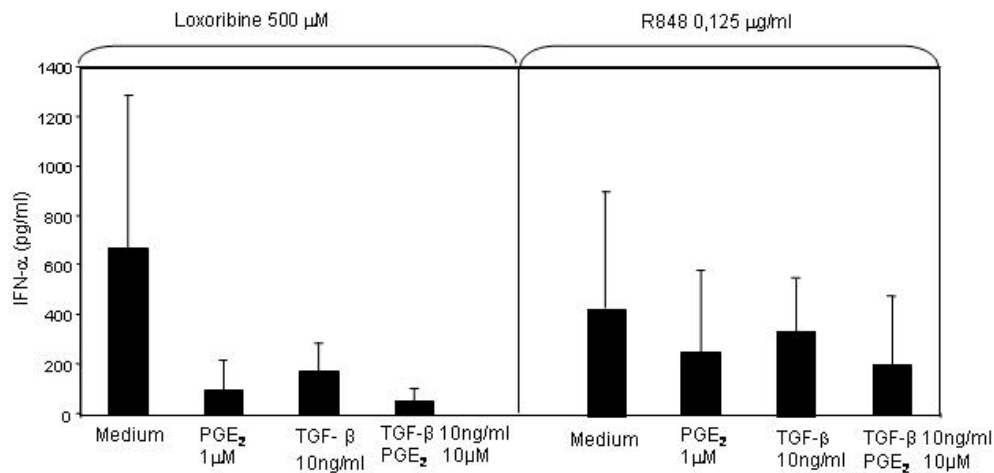


Abbildung 11 PGE₂ hemmt die Produktion von IFN-α auch bei TLR 7-Stimulation mit R848 und Loxoribine

PDCs (25.000/200μl) wurden für vier Stunden mit 1 μM PGE₂ bzw. 10 ng/ml TGF-β bzw. der Kombination aus beiden Faktoren präinkubiert. Danach folgte über 24 Stunden eine Stimulation mit Loxoribine (500 μM) und mit R848 (0,125 μg/ml). Die Konzentration von IFN-α in den Überständen wurde per ELISA bestimmt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus vier Experimenten mit der dazugehörigen Mittelabweichung.

Um an dieser Stelle untersuchen zu können, ob die Hemmung der IFN-α- und TNF-α-Sekretion durch PGE₂ und TGF-β auf eine spezifische Hemmung des TLR-Signalwegs zurückzuführen ist oder ob diese Substanzen vielmehr unspezifisch die Sekretion der gezeigten Zytokine hemmen, sollte die PDC mit einem TLR-unabhängigen Stimulus zur IFN-α-Synthese angeregt werden. Die Stimulation mit PMA (10 ng/ml) plus/minus Ionomycin (1 μg/ml) führte jedoch bei fünf Spendern nach 24 Stunden Stimulation nicht zu messbaren IFN-α-Werten in den PDC-Überständen (Daten nicht gezeigt).

3.5 Forskolin zeigt die gleichen Effekte wie PGE₂

Forskolin ist ein Aktivator der Adenylatzyklase, d. h. die Substanz kann direkt die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen. Um zu zeigen, ob die beschriebenen PGE₂-vermittelten Effekte auf eine Erhöhung der cAMP-Konzentration zurückzuführen sind, wurde der Einfluss von Forskolin auf die Zytokinsekretion der PDC untersucht.

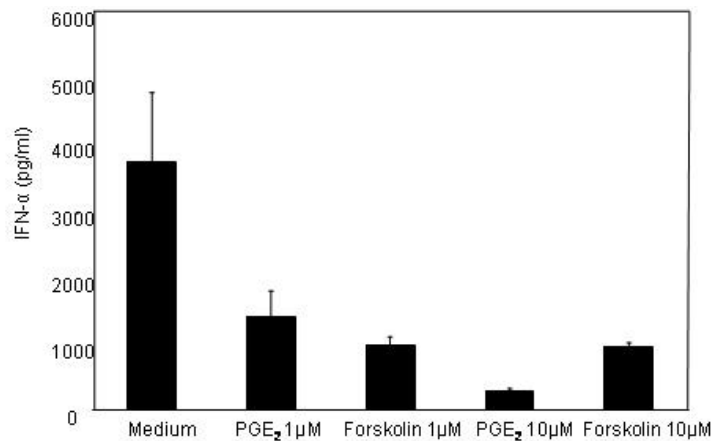


Abbildung 12 **Forskolin imitiert die PGE₂-Wirkung bei Stimulation mit CpG-B**

PDCs (25.000/200μl) wurden über vier Stunden mit 1 μM Forskolin bzw. 10 μM Forskolin und den entsprechenden Konzentrationen an PGE₂ präinkubiert. Die Stimulation mit CpG-B 2006 erfolgte über 24 Stunden. Die IFN-α-Spiegel wurden per ELISA bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit dazugehöriger Mittelabweichung

Wie in Abbildung 12 ersichtlich, lassen sich nach Forskolin-Präinkubation ähnlich inhibierende Effekte auf die IFN-α-Produktion beobachten wie bei PGE₂. Auch bei einer Stimulation mit dem TLR 7-Stimulus R848 zeigte sich dieser Effekt (Abbildung 13). Desweiteren ließ sich eine Reduktion der TNF-α-Freisetzung sowie eine Induktion von IL-6 beobachten (Daten nicht gezeigt). Es lässt sich demnach schlussfolgern, dass die PGE₂-vermittelten Effekte auf eine cAMP-Erhöhung zurückzuführen sind.

Down-stream resultiert eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration häufig in einer Proteinkinase-A-Aktivierung (PKA). H-89 ist ein PKA-Inhibitor, der diese nachfolgende Aktivierung verhindern kann. Der Inhibitor wurde 20 Minuten vor der vierstündigen Präinkubation mit PGE₂ bzw. Forskolin in einer Konzentration von 50 bzw. 100 nM zu 25.000 PDCs gegeben, danach wurde 24 Stunden mit CpG-B stimuliert. Es konnte keine Hemmung der PGE₂-vermittelten Effekte beobachtet werden. Im Gegenteil führte die PKA-Hemmung z. T. zur weiteren Abnahme der IFN-α-Produktion, so dass auch toxische Effekte nicht ausgeschlossen werden konnten.

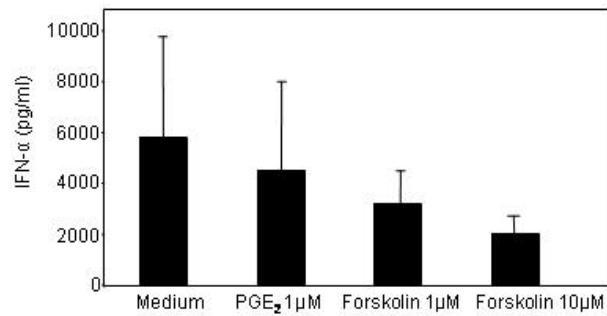


Abbildung 13 **Forskolin imitiert die PGE₂-Wirkung bei Stimulation mit R848**
PDCs (25.000/200 μl) wurden über vier Stunden mit 1 μM Forskolin bzw. 10 μM Forskolin und den entsprechenden Konzentrationen an PGE₂ präinkubiert. Die Stimulation mit R848 0,25 μg/ml erfolgte über 24 Stunden. Die Analyse des im Überstand enthaltenen IFN-α erfolgte mittels ELISA. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit der dazugehörigen Mittelabweichung.

3.6 PGE₂ und Forskolin induzieren keinen Calcium-Flux

Da anzunehmen war, dass die beobachteten Effekte von PGE₂ auf eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung zurückzuführen sind, die nachfolgend zu einer Proteinkinase-A-vermittelten Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher führen kann, wurde der Calcium-Flux in der PDC nach Zusatz von PGE₂ gemessen. Die Detektion des Calcium-Flusses wurde wie unter 2.2.5.4 beschrieben durchgeführt. Weder die Stimulation mit PGE₂ (Abbildung 14) noch mit Forskolin (nicht gezeigt) führte zu einer signifikante Veränderung der Fluoreszenzintensität, die auf einen intrazellulären Calciumstrom hindeuten würde. Lediglich die als Positivkontrolle dienende Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin zeigte den erwarteten Fluoreszenzanstieg. Die beobachteten PGE₂-Effekte gehen demnach nicht mit einer frühen intrazellulären Calcium-Freisetzung einher.

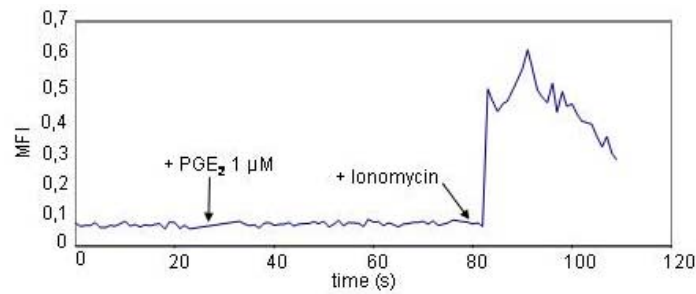


Abbildung 14 PGE₂ induziert keinen Calcium-Flux in PDCs

100.000 PDCs wurden mit den Calcium-sensitiven Farbstoffen Fluo-3 und FuraRed sowie dem Lösungsvermittler Pluronic im Brutschrank inkubiert. Die Zugabe von 1 µM PGE₂ erfolgte nach 25 Sekunden Messzeit. Um zu zeigen, dass die Zellen intakt waren und die Konjugation mit den Farbstoffen funktioniert hatte, wurde der Maximalstimulus Ionomycin nach 80 Sekunden zugegeben. Der Calciueinstrom setzte unverzüglich ein und bedingte einen deutlichen Fluoreszenzanstieg.

3.7 Identifizierung des EP₂-Rezeptors

Da es bisher in der Literatur keinerlei Angaben darüber gibt, welche EP-Rezeptoren auf der PDC exprimiert werden, wurde RNA aus PDCs isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine RT-PCR durchgeführt (wie unter 2.3 beschrieben). Es ließ sich eindeutig der EP₂-Rezeptor bestimmen.

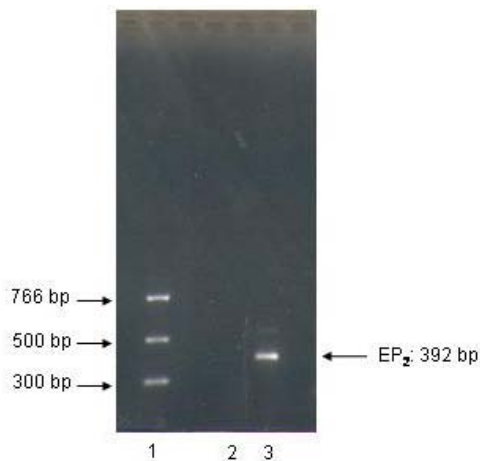


Abbildung 15 RT-PCR auf den EP₂-Rezeptor bei PDCs

Aus 700.000 PDCs wurde RNA isoliert (2.3.1), photometrisch vermessen, in cDNA umgeschrieben (2.3.2) und eine PCR durchgeführt (2.3.3). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch (2.3.4) analysiert. Die Abbildung zeigt die Expression des EP₂-Rezeptors.

1: Marker (2.1.3), 2: Wasserkontrolle 3: PDC cDNA

3.8 Effekte verschiedener Prostanoid-Agonisten auf die PDC

Die beobachteten PGE₂-Effekte können über unterschiedliche EP-Rezeptoren vermittelt werden. Um zu bestimmen, welche Rezeptoren auf PDCs exprimiert werden, wurden selektive EP-Agonisten getestet, deren Spezifitäten in 1.6.1 dargestellt wurden. Abbildung 16 zeigt, dass bei dem EP₂-selektive Agonist Butaprost die geringere Konzentration von 100 nM zur Induktion von IFN- α führte, während die Konzentration von 10 μ M inhibitorisch wirkte. Der EP₂/EP₄-Agonist 11-deoxy-PGE₁ wirkte in allen getesteten Konzentrationen inhibitorisch auf die IFN- α -Produktion. Sulprostone als EP₁/EP₃-Agonist induzierte in allen Konzentrationen die Synthese von IFN- α . Toxische Effekte konnten ausgeschlossen werden, da alle Agonisten in der Lage waren in den jeweils getesteten Konzentrationen IL-6 zu induzieren.

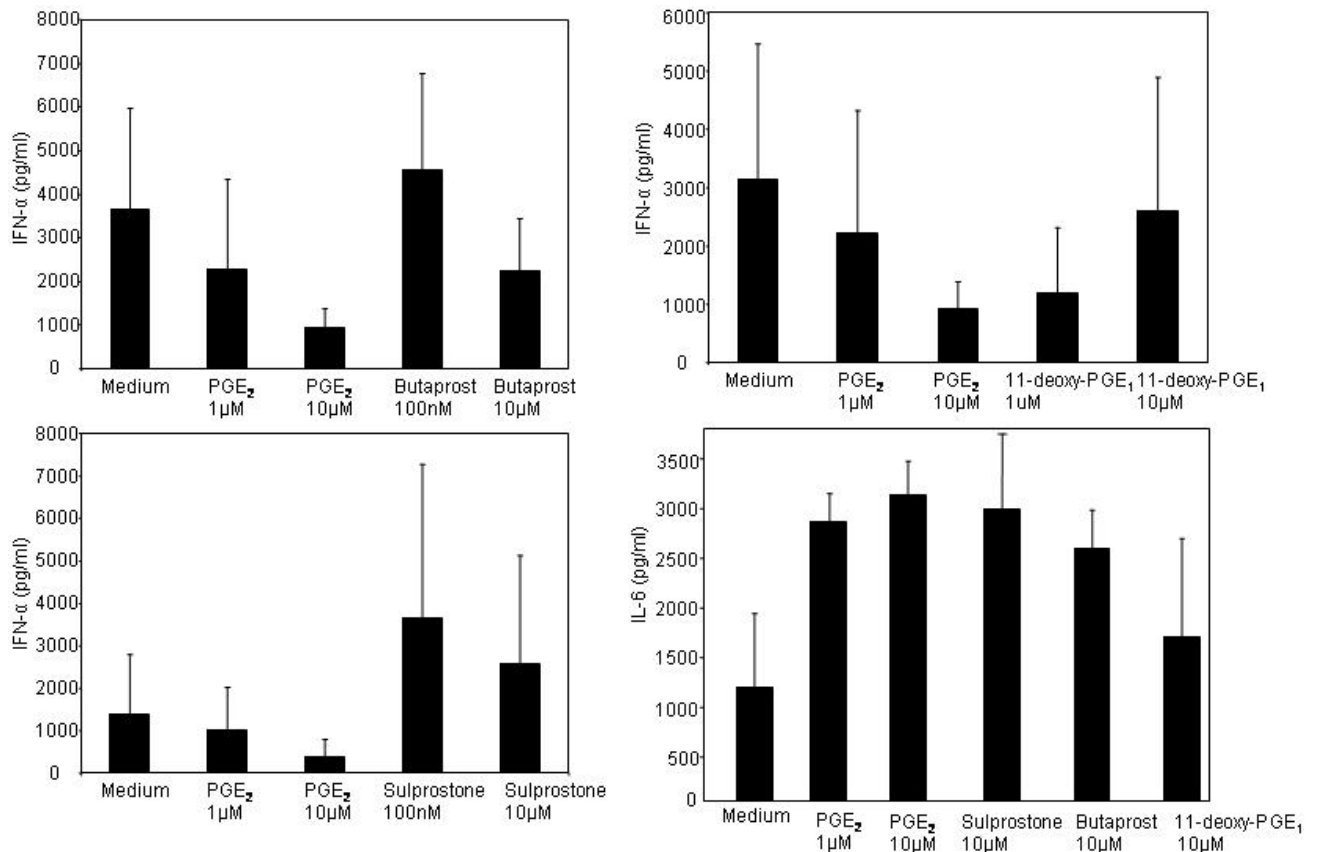


Abbildung 16 IFN- α - und IL-6-Induktion durch verschiedene EP-Agonisten in der PDC

PDCs (25.000/200 μ l) wurden über vier Stunden mit verschiedenen EP-Agonisten in unterschiedlichen Konzentrationen präinkubiert. Die Stimulation mit CpG-B erfolgte über 24 Stunden. Die Analyse des im Überstand enthaltenen IFN- α und IL-6 erfolgte mittels ELISA. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte aus vier (IFN- α) bzw. zwei (IL-6) unabhängigen Experimenten mit der dazugehörigen Mittelabweichung.

3.9 Der ALK5-Inhibitor SB-431542 induziert IFN- α in PDCs

Um nachzuweisen, über welche Signalkaskaden die Effekte von TGF- β in PDCs vermittelt werden, wurden Versuche mit dem ALK5-Inhibitor SB-431542 durchgeführt. Dieser inhibiert, wie in 1.7.1 erwähnt, die Smad-vermittelte Signaltransduktion.

Eine 20-minütige Inkubation der PDCs mit dem ALK5-Inhibitor vor der Zugabe von TGF- β führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der IFN- α -Produktion. TGF- β -inhibierende Effekte ließen sich dennoch feststellen, so dass es in der PDC offensichtlich Smad-unabhängige Signalkaskaden gibt.

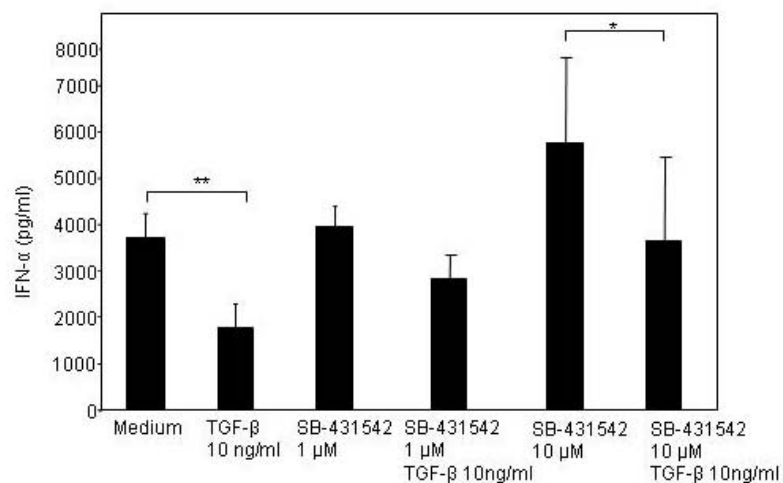


Abbildung 17 Der ALK5-Inhibitor SB-431542 induziert IFN- α in PDCs

PDCs (25.000/200 μ l) wurden 20 Minuten vor Zugabe von TGF- β mit dem ALK5-Inhibitor SB-431542 inkubiert. Darauf folgte eine vierstündige Präinkubation mit TGF- β 10 ng/ml und anschließend eine 24-stündige Stimulation mit ODN 2006. Der Gehalt an IFN- α in den Überständen wurde mittels ELISA bestimmt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus vier Experimenten mit der dazugehörigen Mittelabweichung.

3.10 PGE₂ induziert CD86, TGF- β induziert CD80

Im nächsten Abschnitt dieser Arbeit werden Experimente gezeigt, die der Analyse des Phänotyps der PDC unter PGE₂- und TGF- β -Behandlung dienen. Sie wurden durchgeführt, um Aussagen darüber machen zu können, ob zusätzlich zum veränderten Zytokinmuster auch Unterschiede in der CpG-induzierten Aufregulation

von Aktivierungsmarkern und der Maturation der PDC durch PGE₂ und TGF-β zu beobachten sind.

CD80 und CD86 sind klassische kostimulatorische Moleküle, die auf Antigen-präsentierenden Zellen nach Stimulation exprimiert werden. Sie fungieren als Liganden für CD28/CD152, die auf T-Zellen exprimiert sind. Ohne dieses sogenannte zweite Signal (erstes Signal ist die Antigenpräsentation an sich) ist eine effektive T-Zellstimulation nicht möglich. Abbildung 18 veranschaulicht die Expression von CD86 nach Vorbehandlung mit PGE₂ und/oder TGF-β und anschließender CpG-DNA-Stimulation. Es zeigte sich, dass PGE₂ zu einer Aufregulation von CD86 führte. Diese war bei TGF-β auch zu beobachten, jedoch geringer ausgeprägt.

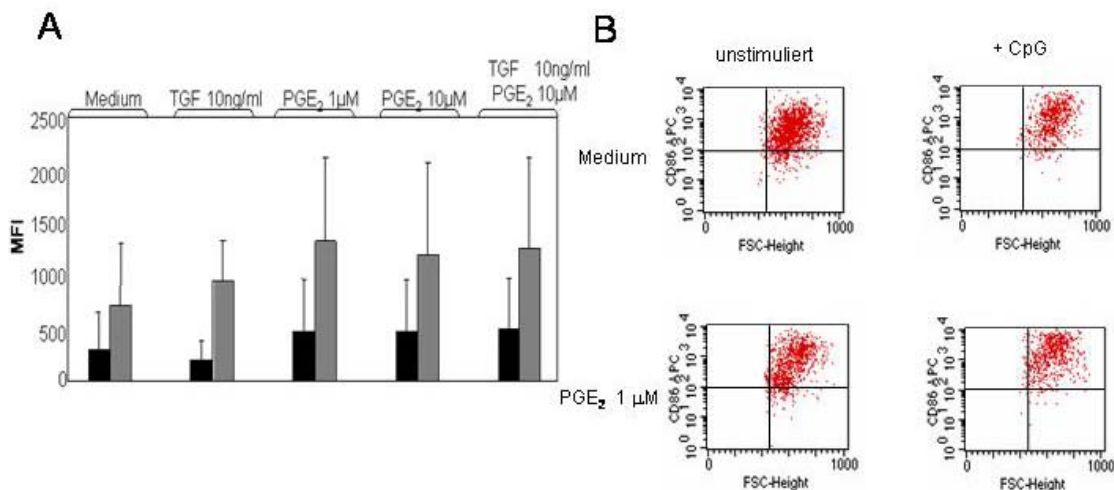


Abbildung 18 PGE₂ induziert CD86 Expression auf PDCs

25.000 PDCs wurden über vier Stunden mit PGE₂ 1 μM bzw. 10 μM bzw. mit TGF-β 10 ng/ml inkubiert und dann für 24 Stunden mit ODN 2006 stimuliert. Danach wurde die Expression von CD86 per FACS-Analyse bestimmt. **A:** Graue Balken zeigen die CpG-stimulierten Bedingungen, schwarze Balken unstimulierte Kontrollen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus zwei Experimenten mit der dazugehörigen Mittelabweichung. **B:** Dot plot Analyse der PDCs aus einem repräsentativen Experiment. Gezeigt ist die CD86-Expression versus Vorwärtsstreuung der PDCs aus dem live gate.

Abbildung 19 zeigt die Aufregulation von CD80 unter dem Einfluss von PGE₂, TGF-β und CpG-B. Zu beobachten war hierbei, dass die Präinkubation mit TGF-β zu einer deutlich stärkeren Expressionszunahme an CD80 führte als mit PGE₂.

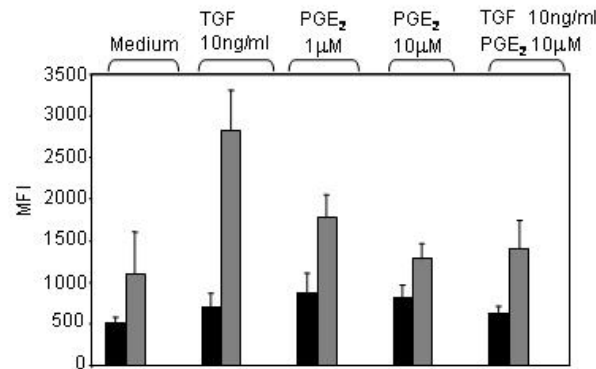


Abbildung 19 TGF- β induziert CD80 Expression auf PDCs

25.000 PDCs wurden über vier Stunden mit PGE₂ 1 μ M bzw. 10 μ M bzw. TGF- β 10 ng/ml inkubiert und dann für 24 Stunden mit CpG-B 2006 stimuliert. Danach wurde die Expression von CD80 per FACS bestimmt. Graue Balken zeigen die CpG-stimulierten Bedingungen, schwarze Balken unstimulierte Kontrollen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus zwei Experimenten mit der dazugehörigen Mittelabweichung.

Im Gegensatz dazu blieb die CD40-Expression nach Inkubation mit PGE₂ 1 μ M und TGF- β 10 ng/ml weitgehend unverändert (Abbildung 20). Erst unter dem Einfluss von PGE₂ 10 μ M konnte eine Reduktion beobachtet werden, ebenso wie bei der Kombination beider Substanzen, was vermutlich auf PGE₂ 10 μ M zurückzuführen ist. Beide Substanzen hemmten jedoch auch deutlich die Expression von HLA-DR (MHC-II) auf der PDC (Daten nicht gezeigt), wodurch deren Fähigkeit zur Antigenpräsentation eingeschränkt ist.

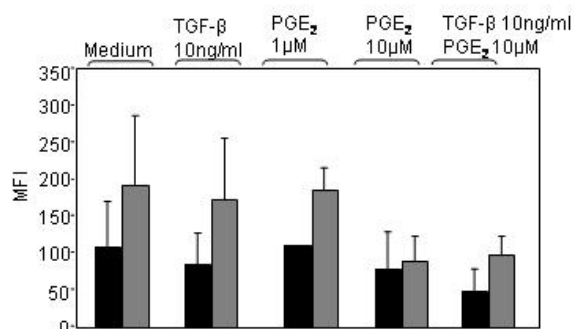


Abbildung 20 PGE₂ 10 μ M hemmt die Expression von CD40

25.000 PDCs wurden über vier Stunden mit PGE₂ 1 μ M bzw. 10 μ M bzw. 10 ng/ml TGF- β inkubiert und dann für 24 Stunden mit ODN 2006 stimuliert. Danach wurde die Expression von CD40 per FACS bestimmt. Graue Balken zeigen die CpG-stimulierten Bedingungen, schwarze Balken unstimulierte Kontrollen. Das Diagramm zeigt drei unabhängige Experimente mit der dazugehörigen Mittelabweichung.

3.11 Migrationsverhalten der plasmazytoiden dendritischen Zelle

CCR7 ist ein Oberflächenrezeptor, der auf vielen Immunzellen exprimiert wird und der seine Liganden CCL19/21 im Bereich der *high endothelial venules* erkennt. Die Bindung von Ligand an Rezeptor löst die Migration der PDCs in Richtung des drainierenden Lymphknotens entlang dem Zytokingradienten aus.

CXCR4 wiederum ist ein Oberflächenrezeptor, der seinen Liganden SDF-1 vor allem in der Peripherie findet, häufig in Tumornähe. Im nachfolgenden Experiment sollte der Einfluss von PGE₂ und TGF-β auf die Expression von CCR7 und CXCR4 auf der PDC analysiert werden.

3.11.1 PGE₂ vermindert die Expression von CCR7 auf der PDC

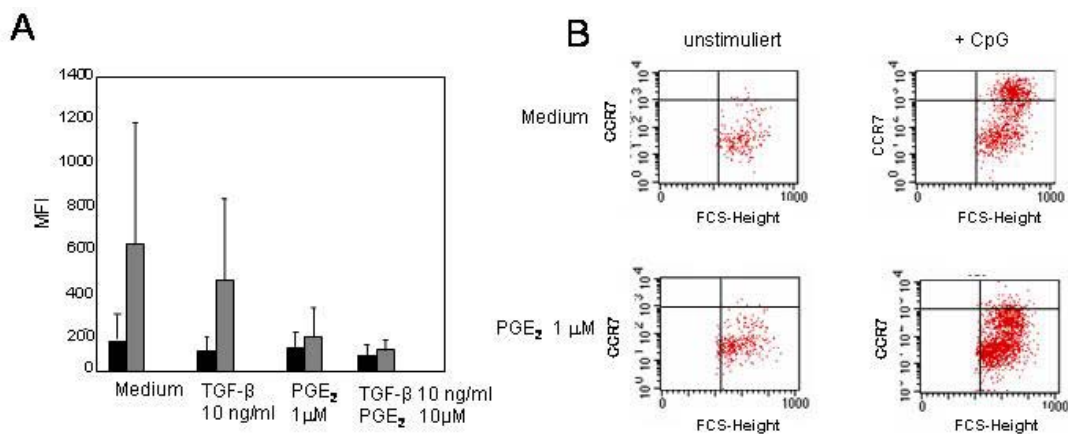


Abbildung 21 PGE₂ und TGF-β vermindern die Expression von CCR7 auf PDCs

PDCs (50.000) wurden für vier Stunden mit PGE₂ 1 μM und 10 ng/ml TGF-β präinkubiert und dann mit CpG-B 2006 für 24 Stunden stimuliert. Die Expression des CCR7-Rezeptors wurde per FACS vermessen. **A**: Graue Balken zeigen die CpG-stimulierten Bedingungen, schwarze Balken sind unstimuliert. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus zwei Experimenten mit der dazugehörigen Mittelabweichung **B**: Dot plot Analyse der PDCs aus einem repräsentativen Experiment. Gezeigt ist die CCR7 Expression versus Vorwärtsstreuung der PDCs aus dem live gate.

Die FACS-Analyse zeigte, dass unstimulierte Kontrollen ein niedriges Basisexpressionsniveau von CCR7 aufwiesen, erst die CpG-stimulierten Bedingungen

zeigten eine bedeutende Expression des Chemokin-Rezeptors. Die Vorbehandlung mit PGE₂ und TGF- β führte wiederum zu einer Reduktion der Expression des CCR7-Rezeptors in unstimulierten und stimulierten Bedingungen. Diese Abnahme der Expression bedingt, dass die so behandelten PDCs nur zu einer eingeschränkten Migration in Richtung Lymphknoten befähigt sind.

3.11.2 PGE₂ erhöht die Expression von CXCR4 auf der PDC

CXCR4 ist ein Rezeptor, der auch auf PDCs exprimiert wird und nach Bindung des Liganden SDF-1 zur Zellaktivierung führt. SDF-1 liegt in der Peripherie in höherer Konzentration vor und wird außerdem häufig von Tumoren sezerniert.

Im Gegensatz zur CCR7-Expression bewirkten sowohl PGE₂ alleine als auch in Kombination mit TGF- β eine Aufregulation von CXCR4 auf der PDC, mit und ohne CpG-DNA-Stimulation. CXCR4-Aktivierung begünstigt ein Zurückhalten in der Peripherie.

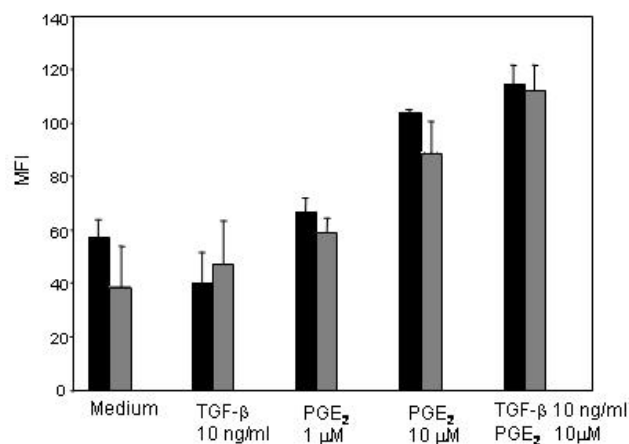


Abbildung 22 PGE₂ und TGF- β führen zu einer Aufregulation von CXCR4 auf PDCs

PDCs (50.000) wurden für vier Stunden mit 1 und 10 μ M PGE₂ und 10 ng/ml TGF- β präinkubiert und dann mit CpG-B 2006 für 24 Stunden stimuliert. Die Expression des CXCR4-Rezeptors wurde per FACS vermessen. Die grauen Balken zeigen die CpG-stimulierten Bedingungen, schwarze Balken sind unstimuliert. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus zwei Experimenten mit der dazugehörigen Mittelabweichung

Aufgrund der Expressionsrate dieser beiden Rezeptoren folgte die Hypothese, dass die PDC ein verändertes Migrationsverhalten speziell unter PGE₂-Einfluss aufweist. Um

diese zu prüfen, wurde ein Migrationsassay durchgeführt (siehe 2.2.4). Hierbei migrierten PDCs durch eine Polycarbonat-Membran mit einer Porengröße von 0,5 μm auf den CXCR4-Liganden SDF-1 (100 ng/ml). Es erfolgte keine CpG-Stimulation. Der zahlenmäßig relativ geringe Unterschied der migrierten Zellen zwischen mit/ohne PGE₂-Zusatz korreliert mit der in der Durchflußzytometrie beobachteten nur geringen Zunahme der Expressionsrate des Rezeptors.

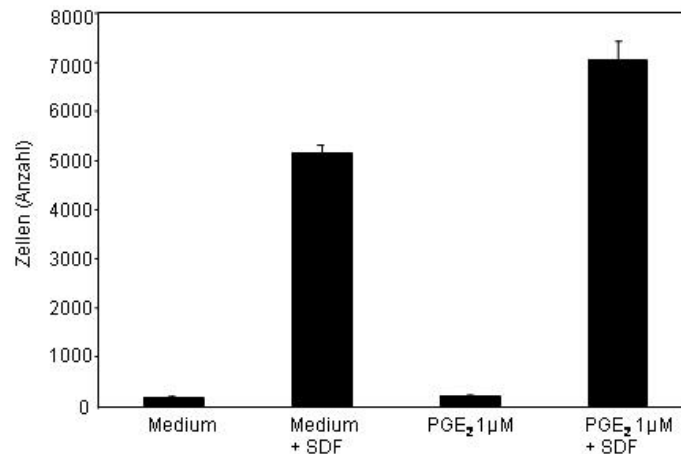


Abbildung 23 PGE₂-inkubierte PDCs migrieren vermehrt auf SDF-1

50.000 PDCs wurden zwei Stunden mit PGE₂ 1 μM im Brutschrank präinkubiert. Danach erfolgte über weitere zwei Stunden eine Migration auf 100 ng/ml SDF-1 durch eine Polycarbonatmembran der Porengröße 0,5 μm wie unter 2.2.4 beschrieben. Das Diagramm zeigt ein repräsentatives Experiment, angesetzt in Triplikaten.

3.12 TGF- β induziert IL-12

Krug et al. konnten zeigen, dass die PDC neben den oben genannten Zytokinen ebenfalls IL-12 produzieren kann. Benötigt wurden dazu eine Präinkubation mit IL-3 und nachfolgend die zeitgleiche Stimulation mit CD40L und CpG-B [Krug et al. 2001b].

Während PGE₂ und TGF- β bisher gleichartige bzw. zum Teil synergistische Effekte zeigten, stellte sich heraus, dass dies in Hinblick auf die Produktion von IL-12 nicht der Fall war. PGE₂ hemmte, wie erwartet, die Produktion von IL-12 (Daten nicht gezeigt), TGF- β induzierte IL-12p40 ebenso wie die bioaktive Form IL-12p70.

Abbildung 24 zeigt die Induktion von IFN- α , IL-12p40 und IL-12p70 nach einer 24-stündigen Präinkubation mit IL-3, einer vierstündigen TGF- β -Inkubation und der nachfolgenden, zeitgleichen Stimulation mit CD40L und CpG-B über weitere 24 Stunden. Der CD40L wird von einer BHK-CD40L-tragenden Zelllinie zur Verfügung gestellt (2.2.3.1).

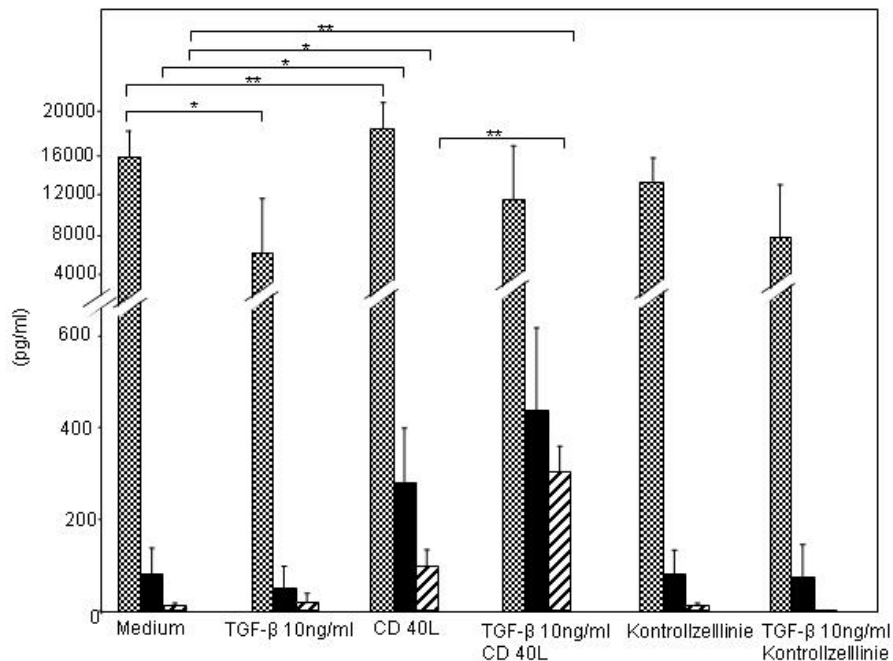


Abbildung 24 TGF- β induziert die Bildung von IL-12p40 und IL-12p70

PDCs (25.000/200 μ l) wurden mit IL-3 über 24 Stunden präinkubiert. Danach folgte in den so bezeichneten Bedingungen eine vierstündige Inkubation mit TGF- β 10 ng/ml. Anschließend wurde mit der Zelllinie BHK-CD40L bzw. der Kontrollzelllinie und in allen Bedingungen mit CpG-B stimuliert. Die Abnahme der Überstände fand nach 24 Stunden statt, die Quantifizierung der darin befindlichen Zytokine IFN- α (gepunktete Balken), IL-12p40 (schwarze Balken) und IL-12p70 (gestreifte Balken) wurde per ELISA durchgeführt. Das Diagramm zeigt unabhängige Experimente mit 5 Spendern und die dazugehörige Mittelabweichung.

Um sicher zu gehen, dass es sich bei den IL-12 produzierenden Zellen um PDCs handelte, wurde ein *sorting*-Experiment durchgeführt (Abbildung 25). Dazu wurden frisch isolierte PDCs als lineage⁻, CD123^{high}, HLA-DR⁺⁺⁺ und CD11c⁻ über einen MoFloTM Zellsorter gesortet (Dr. J. Ellwart, GSF, München). Die so erhaltene Population wies eine Reinheit von 99,97% auf. Es zeigte sich auch hier eine Induktion der IL-12p40 und IL-12p70 Produktion unter TGF- β Präinkubation.

Ebenso wurden aus PDC-Populationen CD19⁺-Zellen depletiert, um eine Beteiligung von B-Zellen auszuschließen. Die Induktion von IL-12p70 aber auch von IFN- α verminderte sich um ca. ein Drittel (Daten nicht gezeigt).

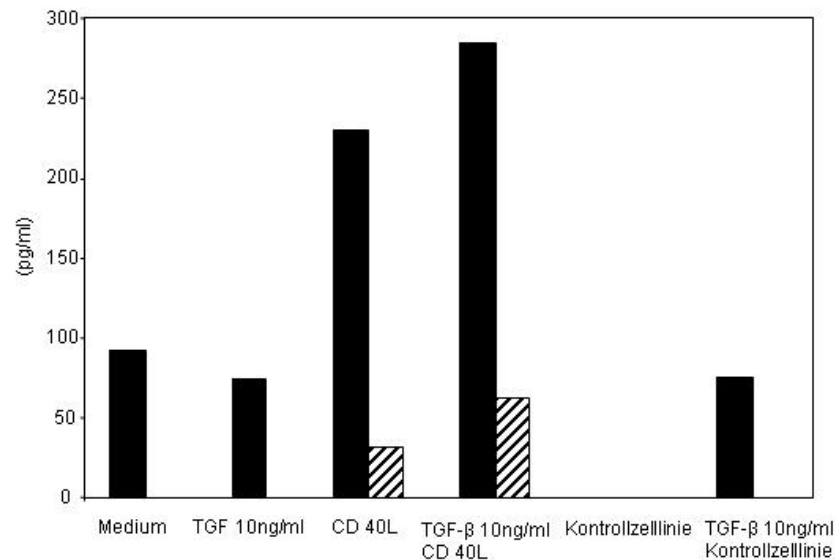


Abbildung 25 TGF- β induziert IL-12p40 und IL-12p70 in gesorteten PDCs

PDCs (25.000/200 μ l) wurden mit IL-3 über 18 Stunden präinkubiert. Danach folgte eine vierstündige Inkubation mit TGF- β 10 ng/ml. Anschließend wurde mit der Zelllinie BHK-CD40L bzw. der Kontrollzelllinie und CpG-B stimuliert. Die Abnahme der Überstände fand nach 24 Stunden statt, die Quantifizierung der darin befindlichen Zytokine IL-12p40 (schwarze Balken) und IL-12p70 (gestreifte Balken) wurde per ELISA durchgeführt. Das Diagramm zeigt ein repräsentatives Experiment.

Um festzustellen, welchen Effekt die Präinkubation von IL-3 auf das Ausmaß der IL-12-Produktion hat, wurde eine Kinetik durchgeführt. Dabei wurden die PDCs über 17, 34, 67 und 90 Stunden mit IL-3 präinkubiert, anschließend wurde mit CD40L bzw. der Kontrollzelllinie und CpG-B über 24 Stunden stimuliert. Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, hat die Präinkubation mit IL-3 signifikanten Einfluss auf die Produktion von IL-12. Es wird gezeigt, dass ein Optimum bei etwa 34 Stunden Präinkubation liegt. Gänzlich fehlendes IL-3 resultierte in einer verschwindend geringen Menge IL-12p40 und IL-12p70 (Daten nicht gezeigt). Interessant war, dass die Produktion von IFN- α und IL-12 nicht zeitlich versetzt stattfand, sondern beide Zytokine eine ähnliche Abhängigkeit in Bezug auf die IL-3-Präinkubation zeigten.

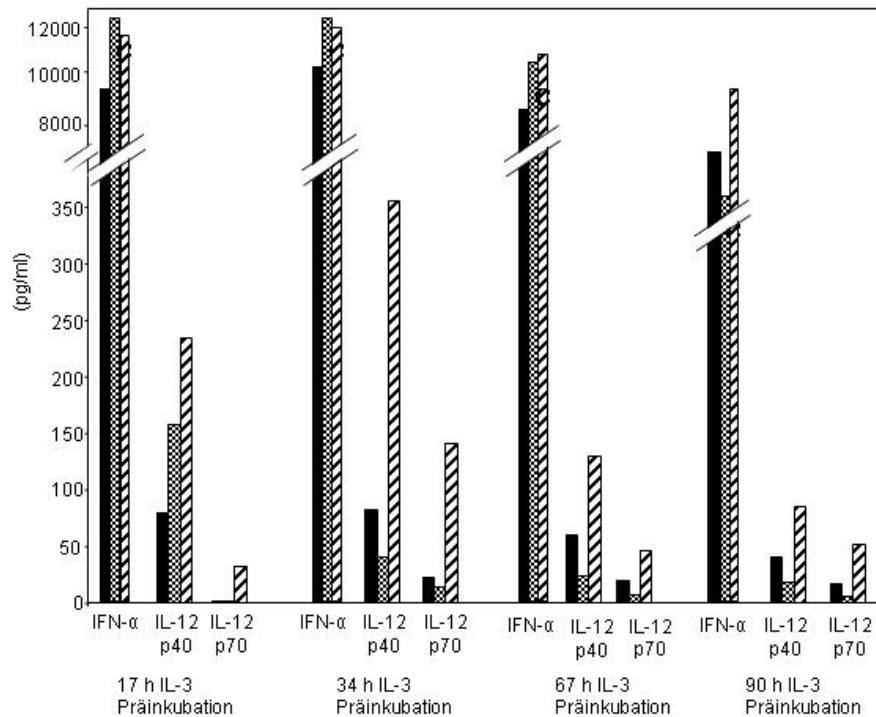


Abbildung 26 Kinetik der IL-3-Präinkubation auf PDCs

PDCs (25.000/200 μ l) wurden über 17, 34, 67 und 90 Stunden mit IL-3 präinkubiert. Danach folgte jeweils eine 24-stündige Stimulation mit CD40L (gestreifte Balken) bzw. der Kontrollzelllinie (gepunktete Balken) und immer mit CpG-B. Schwarze Balken zeigen die CpG-stimulierten Bedingungen. Die in den Überständen enthaltenen Zytokine wurden mittels ELISA quantifiziert. Das Diagramm zeigt ein repräsentatives Beispiel.

Um die Frage zu klären, ob lediglich die Stimulation mit CpG-B eine auf TGF- β zurückzuführende Induktion von IL-12 zu vermitteln vermag, wurden andere TLR-Liganden getestet. Es handelte sich um die TLR 7-Liganden Loxoribine und R848 sowie den TLR 9-Liganden ODN 2216. Abbildung 27 verdeutlicht, dass auch eine Stimulation mit anderen TLR-Liganden als CpG-B eine Induktion von IL-12p40 und IL-12p70 unter TGF- β bewirkte. Die verschiedenen TLR-Liganden waren jedoch nicht so potent in der Induktion von IL-12 wie CpG-B.

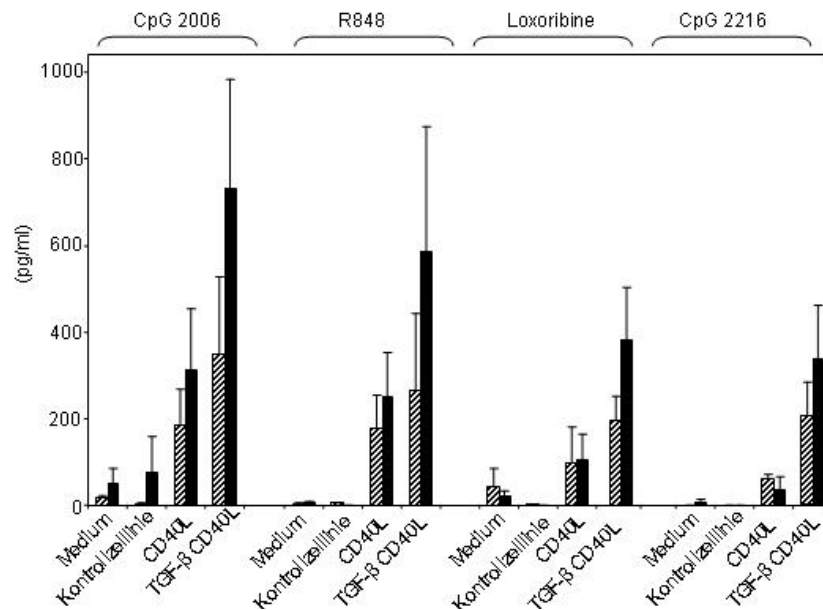


Abbildung 27 Nicht nur CpG-B induziert IL-12p40 und IL-12p70 in PDCs

PDCs (25.000/200µl) wurden über 30 Stunden mit IL-3 präinkubiert. Danach folgte eine vierstündige Präinkubation mit TGF-β 10 ng/ml sowie eine 24-stündige Stimulation mit CD40L bzw. der Kontrollzelllinie sowie den verschiedenen TLR-Liganden. ODN 2006 (3 µg/ml), R848 (0,25 µg/ml), Loxoribine (500 µM) und ODN 2216 (3 µg/ml). Die Quantifizierung von IL-12p40 (schwarze Balken) und IL-12p70 (gestreifte Balken) erfolgte per ELISA. Das Diagramm zeigt Experimente mit vier Spendern und die dazugehörige Mittelabweichung.

Zusätzlich zur BHK-CD40L Zelllinie wurden sowohl die LTK-Zelllinie als auch rekombinanter CD40L getestet (2.2.3.1). Während eine Stimulation mit rekombinantem CD40L erfolglos blieb, zeigte die CD40L-tragende Zelllinie LTK eine im Vergleich zu BHK-CD40L noch gesteigerte Produktion von IL-12 unter der Präinkubation mit TGF-β (Daten nicht gezeigt).

Eine FACS-Analyse der IL-3 präinkubierten PDCs zeigte einen allgemein reiferen Status mit einer leichten Aufregulation von CD40 (Daten nicht gezeigt). Die Präinkubation mit TGF-β führte hingegen zu keiner Veränderung der CD40-Expression (Abbildung 20).

4 Diskussion

4.1 Einfluss von PGE₂ und TGF-β auf die plasmazytoide dendritische Zelle

4.1.1 Zytokinprofil

4.1.1.1 Einfluss auf IFN-α und der Einsatz von COX-Inhibitoren

Die COX-2-Überexpression in Tumoren und die damit verbundene erhöhte Prostaglandin E₂-Synthese gilt, neben TGF-β und IL-10, als einer der stärksten immunsuppressiven Faktoren [Kim et al. 2006]. COX-2-Metabolite haben einen Einfluss auf die Initialisierung, Angiogenese [Masferrer et al. 2000], Invasion, Metastasierung [Tsuji et al. 1997] und die Immunsuppression [Balch et al. 1983] von Tumoren.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass Überstände von Kopf- und Halbtumorzelllinien die IFN-α-Produktion nach CpG-Stimulation inhibierten (Abbildung 6). Die Effekte waren teilweise nach Hemmung der COX-1/2 durch Indometacin reversibel (Abbildung 7). Diese Ergebnisse passen zu klinischen Studien, die belegen, dass COX-Hemmer Erfolge in der Colonkarzinombehandlung, wie z. B. signifikante Größenreduktion und auch komplette Regression, zeigten [Labayle et al. 1991]. Mehrere Mechanismen werden postuliert, um die positiven Effekte von NSAR auf die Tumorregression zu erklären. Zum einen geht man davon aus, dass die COX-Inhibition die PGE₂-vermittelte Hemmung dendritischer Zellen aufheben kann und damit die Präsentation von Tumorantigenen an T-Zellen wieder möglich wird [Sharma et al. 2003], zum anderen wird diskutiert, dass die Verschiebung von primär immunsuppressorisch wirksamem IL-10 zu IL-12 die zelluläre Immunität wiederherstellt [Stolina et al. 2000].

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich jedoch, dass die beobachteten inhibierenden Effekte vermutlich nur zum Teil über PGE₂ vermittelt werden, da ein vollständiges Wiederherstellen der IFN-α-Produktion unter einer COX-Blockade nicht möglich war (Abbildung 7). Die FADU-Zelllinie, als ein nur schwacher PGE₂-Produzent (Tabelle 7), führte zu einer starken Inhibition der IFN-α-Produktion, die sich durch Indometacin nicht vollständig antagonisieren ließ. Zusätzlich zu PGE₂ kommen für den

IFN-I-inhibierenden Effekt aber auch andere Faktoren wie z. B. VEGF, GM-CSF, IL-10 und TGF- β in Frage, welches in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht wurde [Gabrilovich et al. 1996]. Allerdings wurden weder TGF- β noch IL-10 in den hier verwendeten Tumorüberständen nachgewiesen (Tabelle 8). Es ist wahrscheinlich, dass das von FADU produzierte PGE₂ vornehmlich über COX-2 synthetisiert wurde. Verschiedene Studien belegen, dass die COX-2-Expression in unverändertem Gewebe schwach ausgeprägt oder nicht vorhanden ist, während in kanzerogen verändertem Gewebe ein deutlich erhöhter Spiegel zu beobachten ist [Kargman et al. 1995, Sano et al. 1995]. Indometacin weist jedoch eine Präferenz in der Hemmung von COX-1 auf [Mitchell et al. 1993]. Als weiterführendes Experiment wäre hier eine Untersuchung mit einem COX-2-selektiven Inhibitor wie beispielsweise Celecoxib oder NS-398 sinnvoll [Kurumbail et al. 1996].

In den oben beschriebenen Experimenten (Abbildung 7) wurde darüber hinaus beobachtet, dass die zusätzlich mit Indometacin inkubierten PDCs höhere IFN- α -Spiegel aufwiesen als CpG-stimulierte PDCs alleine. Dies lässt zwei mögliche Schlüsse zu. Zum einen, dass die PDC in der Lage ist, selbsttätig PGE₂ zu produzieren. Da COX-1 in vielen Zellen konstitutiv exprimiert wird und keiner zusätzlichen Aktivierung bedarf, kann eine endogene, physiologische PGE₂-Produktion über einen COX-1-abhängigen Syntheseweg vermutet werden. Untersuchte Überstände von PDCs bestätigten das Vorkommen von PGE₂ (s. S. 45) und eine mRNA-Analyse bewies die Expression von COX-2. Eine Untersuchung der COX-1-Expression könnte weitere Aufschlüsse geben. Kerkmann et al. konnten zeigen, dass Typ-I IFN über einen *priming*-Effekt seine eigene Produktion um ein Vielfaches steigern kann [Kerkmann et al. 2003]. Möglicherweise stellt autokrin produziertes PGE₂ einen Mechanismus dar, eine übermäßige IFN-Freisetzung zu regulieren bzw. einzuschränken. Da IFN- α den Arachidonsäurestoffwechsel fördern kann indem es die Freisetzung von Phospholipase A₂ begünstigt [Hannigan und Williams 1991], induziert IFN- α möglicherweise sein eigenes Stoppsignal. Ein anderer bzw. zusätzlicher Schluss ist, dass die Applikation von CpG-DNA die Expression von COX-2 induziert und so eine zusätzlich erhöhte PGE₂-Synthese bedingt. Die Analyse von CpG-stimulierten PDCs bestätigte dies. Die Inkubation mit dem COX-Inhibitor Indometacin würde diese Synthese vermindern, so dass es zu einer Induktion der IFN- α -Synthese käme. Ähnliches beobachteten auch Chen et al., die zeigen konnten, dass CpG-DNA in murinen Zellen die Expression von COX-2, und damit die Synthese von PGE₂, über einen NF κ B-abhängigen Weg induziert [Chen et al. 2001]. Die Hemmung der CpG-induzierten PGE₂-Synthese über COX-Inhibitoren zog eine

Induktion der Zytokin-Produktion und damit eine verbesserte Th₁-Antwort nach sich. Geht man von dieser CpG-induzierten PGE₂-Synthese aus, so wird ersichtlich, dass eine Blockade dieses Effektes zu einer verbesserten Wirksamkeit der CpG-Therapie im Sinne einer noch höheren Immunstimulation führt.

Typ-I Interferone sind Zytokine mit antitumorale Wirkung, die zur Therapie solider Tumoren sowie chronisch myeloischer Leukämie, Non-Hodgkin Lymphom, Hepatitis oder Haarzelleukämie eingesetzt werden [Jonasch und Haluska 2001, Kirkwood 2002]. Ihre Hauptwirkung basiert auf der Initialisierung und Amplifikation nachfolgender Immunreaktionen wie z. B. der Aktivierung von T-Zellen, NK-Zellen und MDCs. Des Weiteren sind Typ-I Interferone potente Inhibitoren der Tumorangiogenese [Carmeliet und Jain 2000]. Tumore weisen viele Mechanismen auf, mit denen sie das humane Immunsystem in seiner Funktionalität beeinträchtigen können. Die synergistische Wirkung von PGE₂ und anderer Mediatoren zeigt, dass lediglich die Blockade eines inhibierenden Faktors, wie beispielsweise durch einen COX-Hemmer, nicht ausreicht, um eine effektive Immunantwort wieder herzustellen. Vielmehr ist es ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die jeder für sich die IFN-Produktion inhibieren und so die Effektivität einer CpG-Therapie gefährden können. Es müssen demnach weitere Therapieansätze gefunden werden, um die vorhandene Immunsuppression zu überwinden.

Die mit den Tumorüberständen erreichte IFN- α -Suppression konnte sowohl bei Verwendung von rekombinantem humanem PGE₂ als auch von rekombinantem humanem TGF- β beobachtet werden. Es zeigte sich, dass die beiden Faktoren in Kombination synergistisch wirkten und zu einer fast vollständigen Blockade der IFN- α -Produktion führten (Abbildung 8).

4.1.1.2 Einfluss auf andere Zytokine

Zusätzlich zur IFN- α -Reduktion fand auch eine TNF- α -Suppression statt (Abbildung 9). TNF- α ist bekannt für seine antitumorale Wirkung, die sich z. B. darauf stützt, dass es Apoptose v. a. in den Endothelzellen der Tumorgefäße auslöst [Old 1984]. Außerdem kann TNF- α die IFN- α Effekte (wie z. B. die IFN- γ -Freisetzung aus NK-Zellen) weiter steigern [Marshall et al. 2006]. Durch Inhibition der TNF- α -Freisetzung wird ein weiterer Verstärker der antitumoralen Immunantwort eingeschränkt.

Ferner wurden auch die Zytokine IL-6 und IL-8 gemessen. Die Wirkung von PGE₂ auf PDCs (auch ohne CpG-Stimulation) resultierte in einer erhöhten Produktion dieser proinflammatorischen Zytokine (Abbildung 10). Diese Befunde werden durch die Literatur bestätigt. Des Weiteren schränkt IL-6 die Entwicklung und Reifung von DCs ein [Gabrilovich 1996, McCoy 2002]. Es wirkt als parakriner und autokriner Wachstumsfaktor beim Non-Hodgkin Lymphom, Blasenkarzinom und Nierenzellkarzinom [Voorzanger et al. 1996, Okamoto et al. 1995]. IL-8 hingegen ist ein Chemokin, das vor allem neutrophile Granulozyten anlockt und außerdem stark angiogenetische Wirkungen aufweist [Koch et al. 1992, Bellocq et al. 1998]. Erhöhte IL-8 Level werden beim Magenkarzinom [Kitadai et al. 1998], Kolonkarzinom [Sakamoto et al. 1992] sowie bei Kopf- und Halstumoren [Eisma et al. 1999] beobachtet. Durch die Induktion von IL-6 und IL-8 wird demnach ein Milieu geschaffen, das sich positiv auf die Proliferation von Tumorzellen auswirkt. Dies wird durch Ambrus et al. bestätigt, die berichten, dass in Gewebe von Karposi-Sarkomen hohe Spiegel an PGE₂ und IL-6 nachweisbar sind, während die IFN- α -Werte erniedrigt sind [Ambrus et al. 1992].

4.1.2 Kostimulatorische Moleküle

Um zu klären, ob die PDCs unter PGE₂ und TGF- β -Behandlung aktiviert sind, wurde die Expression von CD80/86 untersucht (Abbildung 18 und 19). CD80/86 sind klassische kostimulatorische Moleküle, die auf Antigen-präsentierenden Zellen nach Aktivierung aufreguliert werden und T-Zell-exprimierte Rezeptoren kostimulieren (CD28/CD152). Die hier aufgezeigten Ergebnisse zeigten, dass PGE₂ auf der PDC vornehmlich die Expression von CD86 induzierte, während TGF- β vor allem CD80 erhöhte. Die Kombination der beiden Faktoren resultierte in einer Induktion von CD80/86, wobei jeweils der Einfluss von PGE₂ überwog. Während CD86 - der CD28-Ligand - T-Zellantworten induziert, wird CD80 - dem CD152-Liganden - eine inhibitorische Wirkung zugeschrieben [Linsley et al. 1991 a, b]. Die Aufregulation von CD80 über TGF- β wäre demnach als negativer *feedback* Mechanismus denkbar, der zur Toleranzinduktion bzw. Anergie bei betroffenen T-Zellen führt, was ein Hinweis auf die allgemein immunsuppressorische Wirkung von TGF- β sein kann.

Des Weiteren zeigte sich, dass PGE₂ und TGF- β die Expression des MHC-II-Komplexes hemmen (Daten nicht gezeigt). Da Tumorantigene im MHC-Kontext

präsentiert werden, findet hier eine Einschränkung statt, die die Tumorerkennung behindert.

Da die PDCs unter PGE₂ und TGF- β -Behandlung offensichtlich aktiviert sind, sind sie potentiell in der Lage zu migrieren.

4.1.3 Migrationsverhalten

PDCs sind dendritische Zellen, die sich in sekundären lymphatischen Organen, im Blut, in peripherem Gewebe und damit auch in Tumornähe befinden. Nach Bindung von PAMPs kommt es zur Zytokinproduktion und nach darauffolgender Reifung können diese Zellen in den nächstgelegenen, drainierenden Lymphknoten einwandern und präsentieren dort ihr aufgenommenes Antigen [Fonteneau et al. 2003]. Da für diese gerichtete Wanderung die Expression von Chemokin-Rezeptoren notwendig ist (1.3.3), wurde der Einfluss von PGE₂ und TGF- β auf die Chemokin-Rezeptoren CCR7 und CXCR4 untersucht (Abbildung 21, Abbildung 22).

Der Literatur zufolge ist auf der unreifen, frisch isolierten PDC lediglich der CXCR4-Rezeptor in der Lage, Chemotaxis auszulösen [Penna et al. 2002]. Die in Abbildung 22 gezeigten Ergebnisse bestätigen diese Hypothese, da sich die Expression von CXCR4, ob unstimuliert oder CpG-stimuliert, kaum unterschied. Im Gegensatz dazu zeigten unreife PDCs eine gleichbleibend geringe Expressionsrate an CCR7 (Abbildung 22). Die gezeigten Daten belegen, dass erst die Stimulation mit CpG-DNA hier für die funktionell wichtige Aufregulation von CCR7 sorgt, die die Zelle sensitiv für den migrationsauslösenden Liganden macht. Die Funktionalität des CXCR4-Rezeptors konnte im durchgeführten Migrationsassay (Abbildung 23) bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten weiterhin, dass PGE₂ und TGF- β eine Abregulation von CCR7 bzw. eine Aufregulation von CXCR4 nach sich zogen. Da der Ligand SDF-1 für CXCR4 im Tumor exprimiert wird, sprechen die Ergebnisse dafür, dass PDCs *in vivo* vermehrt in Tumornähe gelockt werden könnten. Diese Hypothese wird durch eine Studie von Zou et al. bestätigt. Zou et al. beobachteten, dass im Blut zirkulierende PDCs aktiv durch die Expression von SDF-1, dem Liganden von CXCR4,

in die Nähe von Tumoren gelockt werden [Zou et al. 2001b]. Die Rekrutierung kann man als Teil der Immunantwort betrachten, da durch die Infiltration des Tumors die PDC Antigen aufnehmen kann. Die PGE₂-induzierte Überexpression von CXCR4 fungiert hier möglicherweise als *tumorescape* Mechanismus, durch die die rekrutierten PDCs im Tumorgewebe zurückgehalten werden und ihr aufgenommenes Antigen nicht im Lymphknoten präsentieren können. Als weitere Funktionen dieser rekrutierten PDCs werden in der Literatur diskutiert, dass sie die Tumorangiogenese fördern [Curiel et al. 2004] bzw. umliegende MDCs in ihrer Antigenpräsentation behindern können [Zou et al. 2001b].

Therapeutisch ist die gemachte Beobachtung ebenfalls von Bedeutung. AMD3100 ist ein CXCR4-Antagonist, der durch Blockade des CXCR4/SDF-1 Signals eine verminderte Infiltration von PDCs in Tumore und eine Abnahme der damit verbundenen Immunsuppression und Angiogenese bewirken kann [Muller et al. 2001].

4.1.4 ALK5-Inhibition als Induktor von IFN- α

Eine weitere therapeutische Strategie, um von Tumoren produzierten Mediatoren entgegen zu wirken, ist die Entwicklung spezieller Inhibitoren des TGF- β -Signalwegs. Man versprach sich Erfolge bei der TGF- β -induzierten Immunsuppression, Neovaskularisation sowie den Einsatz bei multiplen anderen Erkrankungen.

SB-431542 (GlaxoSmithKline) wurde als kompetitiver Antagonist der ATP-bindenden Komponente der *activin like kinase 5* (ALK5) entwickelt [Callahan et al. 2002]. Inman et al. zeigten, dass dieser Inhibitor ebenfalls ALK4 und 7 blockieren kann, da diese drei Kinasen eine zu 80% identische Bindungsstelle in der ATP-relevanten Domäne aufweisen [Inman et al. 2002a]. Unter Berücksichtigung der jeweils natürlich vorkommenden Liganden von ALK4, 5 und 7 werden Aktivin, Nodal und TGF- β induzierte Kaskaden inhibiert [Oh et al. 2000, Reissmann et al. 2001]. SB-431542 hemmt die Phosphorylierung von Smad 2, 3 und 4 sowie deren Translokation in den Nukleus und damit das Ablesen spezifischer Zielgene [Inman et al. 2002b]. TGF- β aktiviert jedoch zusätzlich zum Smad-abhängigen *pathway* auch andere Signalwege. Hierzu gehören p38 MAP-Kinasen, ERK, PI3-Kinasen, JNK und Rho [Wakefield und Roberts 2002]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass fast alle diese Signalkaskaden von SB-431542 (IC₅₀ für ALK5=94nM) nicht beeinflusst wurden, ebenso wenig wie der

der *bone morphogenetic proteins*, ebenfalls Mitglieder der ALK-Familie [Inman et al. 2002a].

Die Wirkungen von SB-431542 lassen sich in zwei Kategorien einteilen. Auf der einen Seite hemmt SB-431542 die TGF- β -induzierte Migration und Invasion sowie wie die VEGF-Produktion [Halder et al. 2005]. Auf der anderen Seite werden aber auch tumorsuppressive Funktionen wie Wachstumshemmung und Apoptose inhibiert. Die Applikation von SB-431542 empfiehlt sich demnach besonders für die Art von Tumoren, die resistent gegenüber den tumorhemmenden Eigenschaften von TGF- β sind [Halder et al. 2005].

In den dargestellten PDC-Experimenten induzierte SB-431542 IFN- α (Abbildung 17). TGF- β kann, ähnlich wie PGE₂, von vielen Zelltypen endogen produziert und sezerniert werden [Letterio und Roberts 1998]. Somit könnte auch die autokrine Freisetzung von TGF- β die PDC in ihrem Ausmass der IFN- α -Sekretion regulieren. Unter Umständen fungiert dieser Regulationsmechanismus als negativer *feedback loop*, der eine überschießende Reaktion verhindern soll. Ähnliche Befunde zeigten auch Meadows et al.. Sie beobachteten, dass die Inkubation von PBMC mit SB-431542 in einer erhöhten IFN- γ -Sekretion durch NK-Zellen resultiert [Meadows et al. 2006]. Eine Blockade mit dem TGF-Inhibitor ist hier genauso potent wie der Einsatz blockierender Antikörper gegen TGF- β . Darauf aufbauend wäre der experimentelle Ansatz interessant, ob die über eine TGF-Blockade vermittelte Induktion von IFN- α die IFN- γ -Sekretion von NK-Zellen steigern könnte. So ließe sich klären, ob es sich um einen direkten Effekt auf NK-Zellen oder eine IFN-vermittelte Beobachtung handelt. Als weiterführendes Experiment bietet sich ebenfalls an, andere am TGF- β -*signaling* beteiligte Signalwege über spezifische Inhibitoren zusätzlich zu blockieren, um deren Beteiligung zu belegen. Zusätzlich zeigten Halder et al., dass SB-431542 die TGF- β induzierte COX-2-Induktion hemmen kann [Halder et al. 2005]. Denkbar wäre demnach auch ein Mechanismus, der die COX-2-vermittelte PGE₂-Produktion der PDC hemmt und somit eine erhöhte autokrine IFN- α -Freisetzung möglich macht.

4.1.5 cAMP als *second messenger* der PGE₂-Effekte

Die vorliegende Dissertation zeigt auf, dass PGE₂ seine Effekte am wahrscheinlichsten über die Induktion von cAMP vermittelt, da Forskolin, als Adenylatzyklase-Aktivator, in der Modulation des Zytokinprofils die gleichen Wirkungen zeigte (Abbildung 12). cAMP ist ein *second messenger*, der häufig an der Regulation immunologischer und entzündlicher Prozesse beteiligt ist [Goodwin und Ceuppens 1983]. Es ist der hauptsächlich vorkommende *second messenger* für PGE₂, wenn die Effekte über den EP₂-und EP₄-Rezeptor vermittelt werden [Honda et al. 1993, Regan et al. 1994].

Schnurr et al. beobachteten, dass die Inkubation von PDCs mit 1 µM PGE₂ eine deutliche Zunahme an cAMP zeigte (PD Dr. med. M. Schnurr, persönliche Mitteilung). Mazzoni et al. zeigten weiterhin, dass Histamin, ein cAMP-Induktor, die IFN-α-Produktion in PDCs hemmen kann [Mazzoni et al. 2003]. Erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentrationen führen häufig zu einer PKA-Aktivierung. Allerdings konnte in den hier gezeigten Experimenten die mit PGE₂ und Forskolin beobachteten Effekte nicht über den PKA-Inhibitor H-89 verhindert werden. Dieser Befund ist auch schon von anderen Gruppen gemacht worden [Zhang et al. 2006, Schmitz et al. 2001] und spricht für einen PKA-unabhängigen Mechanismus. Infrage kommen hierbei cGMP-abhängige Proteinkinasen [Jiang et al. 1992], eine Aktivierung von Proteinkinase-C [Schwartz et al. 1998] oder *guanine nucleotide exchange factors* (cAMP-GEFs, Epac), welche biologische Funktionen von cAMP über PKA-unabhängige Mechanismen vermitteln [de Rooij et al. 1998]. Darüber hinaus beschreiben Fujino et al., dass eine PGE₂-Stimulation des EP₄-Rezeptors auch zu einer Aktivierung des PI3-Kinase-*pathway* führen kann, der wiederum die PKA hemmt [Fujino et al. 2005]. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die Induktion von *inducible cAMP early repressor* (ICER) durch cAMP-Agonisten wie PGE₂ und Forskolin [Bodor et al. 1996, Feng et al. 2006]. ICER ist ein negativer Regulator der cAMP-abhängigen Signaltransduktion [Molina et al. 1993]. Es verhindert die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren an ihre Bindungstellen. Des Weiteren vermag ICER nicht den Transkriptions-Kofaktor CBP/p300 zu rekrutieren, der die Bindung der Transkriptionsfaktoren an den Transkriptionsapparat vermittelt [Bodor et al. 2000]. CBP/p300 ist wichtig für die effektive Transkriptionsaktivität von z. B. *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) und NFκB [Gerritsen et al. 1997]. Interessant ist der Befund, dass Rahman et al. eine Hemmung von p38 MAP-Kinase durch cAMP und eine fehlende Phosphorylierung der Untereinheiten von NFκB beobachten [Rahman et al. 2004]. Weitere Studien berichten, dass cAMP den NFκB-Inhibitor IκB stabilisieren

kann, der NFkB bindet und inaktiviert [Neumann et al. 1995]. Da NFkB und p38 MAP-Kinase in der Induktion von IFN- α durch CpG-DNA eine Rolle spielen [Osawa et al. 2006], lässt sich so möglicherweise die unter PGE₂ beobachtete eingeschränkte Zytokin-Produktion erklären. Andere Studien zeigen hingegen jedoch auch eine induzierte NFkB-Aktivierung unter cAMP [Serkkola und Hurme 1993].

Weiterhin wurde der Calcium-Flux in der PDC nach Stimulation mit PGE₂ bestimmt. Experimente, die ein frühes Calcium-Signal detektierten (Abbildung 14) lassen ein *signaling* über Calcium als unwahrscheinlich erscheinen. Auch die Ergebnisse von Nirodi et al. zeigten, dass lediglich der Glycylester von PGE₂ eine Erhöhung der Calcium-Konzentration bedingt, nicht PGE₂ selbst [Nirodi et al. 2004]. Ebenso kann eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von cAMP zu einer Inhibition des Calcium-*signalings* führen [Kaminuma et al. 1999].

4.1.6 Identifikation vorhandener Prostanoid-Rezeptoren

Die PGE₂-Effekte werden über vier verschiedene EP-Rezeptoren vermittelt. Diese Rezeptoren leiten ihre empfangenen Signale über verschiedene *second messenger*, wie unter 1.6.1 beschrieben, weiter. Um zu bestimmen, welche Rezeptoren auf der PDC exprimiert werden, wurde eine PCR durchgeführt. Bisher konnte sicher die Expression des EP₂-Rezeptors nachgewiesen werden (Abbildung 15). Die Untersuchung der anderen Rezeptoren dauert noch an. Zusätzlich zum molekularbiologischen Nachweis wurden auch EP-selektive Agonisten getestet.

Sulprostone ist ein Agonist der EP-Rezeptoren EP₁ und EP₃, mit einer stärkeren Affinität zu EP₃. Als Maß für die Bindungsaffinität eines Liganden an seinen Rezeptor sei die inhibitorische Konstante (K_i) erwähnt, hier EP₁ $K_i=107$ nM versus EP₃ $K_i=0,35$ nM [Breyer et al. 2001]. Die vierstündige Präinkubation mit Sulprostone resultierte in einer Induktion von IFN- α (Abbildung 16). Denkbar wäre, dass Sulprostone als kompetitiver Antagonist endogenes PGE₂ vom Rezeptor verdrängt ohne jedoch selber intrinsische und damit inhibitorische Aktivität für diesen Rezeptor zu besitzen. Zum anderen ist zu berücksichtigen, dass der EP₃ Rezeptor über fünf oder mehr verschiedene *splice*-Varianten verfügt [Breyer et al. 2001], die möglicherweise über unterschiedliche *second messenger* induktiv auf die IFN- α -Produktion wirken. Eine Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration konnte beispielsweise nicht

beobachtet werden (PD Dr. med. M. Schnurr, persönliche Mitteilung). So ist es möglich, dass es zu einer Erniedrigung intrazellulären cAMP kommt oder der PI3-Kinase-Weg aktiviert wird, so dass inhibitorische Effekte nicht vermittelt werden können sondern sogar im Gegenteil stimulatorische Signalwege aktiviert werden. Feng et al. beschreiben, dass PGE₂ in Abhängigkeit des jeweils aktivierten Rezeptors entweder inhibitorisch oder stimulatorisch auf die Produktion von Mediatoren wirken kann [Feng et al. 2006].

11-deoxy-PGE₁ ist ein EP₂/EP₄-Agonist [Sarrazin et al. 2004], dem teilweise auch eine EP₃-Aktivität zugeschrieben wird [Ono et al. 1998]. 11-deoxy-PGE₁ wirkte in den jeweils getesteten Konzentrationen (1 µM, 10 µM) inhibitorisch auf die IFN-α-Sekretion (Abbildung 16). Ferner erhöhte es auch die intrazelluläre cAMP-Konzentration in PDCs (PD Dr. med. M. Schnurr, persönliche Mitteilung).

Butaprost ist ein selektiver EP₂-Agonist [Gardiner 1986]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Butaprost-Methylester (ME) verwendet, der laut Literatur weniger ausgeprägte Selektivität und Effektivität als die freie Säure Butaprost aufweist [Abramovitz et al. 2000]. Als mögliches weiteres Experiment bietet sich die Verwendung der freien Säure an. In geringen Konzentrationen (100 nM) induzierte Butaprost in den gezeigten Experimenten die Sekretion von IFN-α, in höheren Konzentrationen (10 µM) hemmte es sie (Abbildung 16). Denkbar wäre hier eine konzentrationsabhängige Verdrängung endogenen PGE₂ vom Rezeptor, ohne jedoch einen gewissen Schwellenwert zu überschreiten, der eine Inhibition der IFN-α-Produktion auslöst. Die K_i von Butaprost-ME am EP₂-Rezeptor beträgt 3,5 µM, so dass unterhalb dieses Wertes eine inhibitorische Kapazität unwahrscheinlich ist [Breyer et al. 2001].

Eine Steigerung der Toxizität in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen konnte ausgeschlossen werden, da alle Agonisten in den getesteten Konzentrationen IL-6 induzierten (Abbildung 16). PGE₂ weist diese differenziellen, konzentrationsabhängigen Eigenschaften, auch in geringer (100 nM) Konzentration, nicht auf. Andere Gruppen beobachteten inhibitorische Effekte sogar bis zu einer Konzentration von 1 nM PGE₂ [Son et al. 2006]. Es ist jedoch zu beachten, dass alle Agonisten in jeglicher Hinsicht weniger potent als PGE₂ sind [Feng et al. 2006, Breyer et al. 2001].

4.1.7 TGF- β als Amplifikator der IL-12 Synthese

PDCs sind die einzigen Produzenten von IFN- α im humanen System. Außer IFN- α produzieren PDCs TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12 und IP-10. Hauptproduzenten von IL-12 im humanen System sind jedoch Zellen, die von Monozyten oder Makrophagen abstammen. Während IL-12p40 häufig synthetisiert wird, unterliegt die Sekretion von IL-12p70 strengeren Grundsätzen. IL-12 ist ein Schlüsselzytokin in der Initiation von Immunantworten. Es fördert die Produktion von IFN- γ durch NK- und T-Zellen sowie die Entwicklung von Th₁- und zytotoxischen T-Zellen [Trinchieri 1995].

Eine T-Zell-Kostimulation über CD40-CD40L-Interaktion verbessert in der PDC das Überleben und die Reifung sowie die Induktion von IFN- α . Da PDCs in Tumoren auf aktivierte T-Zellen treffen können, sollte untersucht werden, ob die Effekte von PGE₂ und TGF- β auch bei Kontakt mit diesem Stimulus zu beobachten waren. Da Krug et al. zeigten, dass für die IL-12 Induktion in PDCs eine IL-3-Präinkubation unabdingbar ist, erfolgte eine Präinkubation der PDCs mit IL-3 über Nacht. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl PGE₂ als auch TGF- β bei der alleinigen Stimulation mit CD40L eine eingeschränkte IFN- α -Synthese aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Überstände auf IL-12p40 und IL-12p70 ergab, dass eine alleinige Stimulation mit CD40L verschwindend geringe Mengen an IL-12 induzierte. Die mit dem Doppelsignal CpG-B/CD40L stimulierten Bedingungen (Abbildung 24) zeigten jedoch, dass PGE₂ die Synthese von IL-12p40 und IL-12p70 hemmte, während TGF- β beide induzierte. Auch Schulz et al. berichten, dass in DCs erst die Kombination von mikrobiellem Stimulus und CD40L-Signal die Produktion relevanter Mengen IL-12p70 *in vivo* ermöglicht [Schulz et al. 2000]. Mitsuhashi et al. konnten zeigen, dass die verminderte IL-12-Produktion unter PGE₂-Behandlung auf die eingeschränkte Transkription des p40 Gens zurückzuführen ist [Mitsuhashi et al. 2004] bzw. sich die durch PGE₂ erhöhte cAMP-Konzentration negativ regulatorisch auf die Freisetzung von IL-12p40 und IL-12p70 auswirkt [Braun und Kelsall 2001, Luft et al. 2002].

TGF- β hingegen induzierte in der PDC die Synthese von IL-12p40 und IL-12p70 (Abbildung 24). Duramad et al. konnten zeigen, dass unter den IL-12-produzierenden Zellen außergewöhnlich viele CD86⁺⁺-Zellen intrazellulär zu detektieren waren. TGF- β induziert geringfügig die Expression von CD86 auf der PDC, so dass es einen minimal höheren Prozentsatz CD86⁺⁺-Zellen unter TGF- β -Präinkubation geben kann (Abbildung 18). Die Expression von CD40 bleibt hingegen unter TGF- β unverändert. Die

vermehrte IL-12-Synthese kann also nicht durch eine Aufregulation von CD40 und damit einer besseren Bindung von CD40L erklärt werden. Die Stimulation mit CpG-DNA hingegen erhöht wie erwartet die Expression von CD40 und wird von anderen Gruppen [Schulz et al. 2000] als essentiell für die Induktion von IL-12p70 angesehen.

Da Krug et al. zeigten, dass die Präinkubation mit IL-3 unabdingbar für die Induktion von IL-12 ist, wurde eine Kinetik durchgeführt, um den Effekt von IL-3 zu bestimmen [Krug et al. 2001b]. Es zeigte sich, dass eine Präinkubation über 34 Stunden ein Optimum für die IL-12-Induktion darstellte (Abbildung 26). Übereinstimmend damit wiesen ohne IL-3 behandelte PDCs keinerlei Synthese an IL-12 auf, während die IFN- α -Synthese stark vermindert, aber existent war. Die Präinkubation mit IL-3 führte zu einer leichten Aufregulation von CD40 und vermittelt so möglicherweise eine bessere Ansprechbarkeit auf den CD40L (Daten nicht gezeigt). IL-3 ist ein Zytokin, das in der PDC über den IL-3-Rezeptor CD123 die Reifung der Zelle auslöst. Ähnliche Effekte auf die Reifung und damit verbunden eine verminderte IFN-Synthese hat auch das *crosslinking* von CD123 zur Folge [Fanning et al. 2006].

Während Krug et al. beobachteten, dass die PDCs in Abhängigkeit der Inkubationszeit erst IFN- α und dann IL-12 freisetzen, konnte diese zeitliche Gegenläufigkeit in den hier durchgeführten Experimenten nicht beobachtet werden (Abbildung 26). Es entsteht demnach durch die IL-3-Präinkubation keine neuartige Zelle, die anstatt IFN- α IL-12 produziert. Vielmehr verändert sich die PDC unter IL-3 Einfluss dahingehend, dass sie nun fähig ist zusätzlich dieses Zytokin zu produzieren.

Die in Abbildung 27 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass nicht nur die Stimulation mit CpG-B zur Induktion von IL-12 führte. In den hier gezeigten Resultaten ist die Abfolge in der Induktion der IL-12-Produktion umgekehrt zu der der IFN- α -Produktion. In der Induktion von IL-12 ist folgende Reihenfolge zu erkennen: CpG-B > R848 > Loxoribine > CpG-A. CpG-B ist das ODN, welches in der PDC vor allem die Differenzierung und Reifung auslöst, während die IFN- α -Induktion unter CpG-A stärker ist [Krug et al. 2001]. R848 löst in der PDC eine Reifung vergleichbar mit der unter IL-3 aus [Gibson et al. 2002]. Duramad et al. untersuchten ebenfalls die Induktion von IL-12p40 und IFN- α durch die drei verschiedenen CpG-Klassen [Duramad et al. 2003]. Analog zu den oben gezeigten Ergebnissen (Abbildung 27)

wiesen sie nach, dass CpG-B das potenteste ODN hinsichtlich der Induktion von IL-12 war.

Wagner et al. konnten zeigen, dass auch B-Zellen unter CD40L/CpG-B Stimulation zur IL-12p70-Synthese fähig sind [Wagner et al. 2004]. Um auszuschließen, dass es sich bei den hier gezeigten Effekten um eine Verunreinigung mit B-Zellen handelte, wurden vor der PDC-Isolation CD19⁺-Zellen depletiert. Die Induktion von IL-12p70 verminderte sich ungefähr um ein Drittel (Daten nicht gezeigt). Die gleiche Abnahme war auch in der Induktion von IFN- α zu beobachten, so dass die Vermutung nahe liegt, dass die Reduktion mit der Depletion von in der Literatur bekannter CD19⁺-PDCs zusammenhängt [Munn et al. 2004, Rissoan et al. 2002b]. Auch das *sorting*-Experiment zeigte, dass die beobachtete IL-12p40 und IL-12p70 Produktion auf PDCs zurückzuführen ist. Die verhältnismäßig geringe Menge an Zytokin lässt sich zum einen damit erklären, dass die Zellen aufgrund der langen Transportwege zum Zellsortier gestresst waren. Zum anderen wurde lediglich eine 18-stündige Präinkubation mit IL-3 durchgeführt, die keine optimale Induktion ermöglichte.

Die synergistische Aktivität von CpG-DNA, IL-3, TGF- β und CD40L ist ein naheliegender physiologischer Zustand. An Infektionsherden bzw. im Tumor erfolgt die Produktion von IL-3 und CD40L z. B. über aktivierte T-Zellen [Guba 1989, Balch et al. 1990], die häufig in Tumore einwandern. TGF- β kann von der PDC selbst zur Verfügung gestellt werden, oder aber von vielen anderen, umgebenden Immunzellen [Chen und Wahl 1999]. Als TGF- β -Quelle kämen auch regulatorische T-Zellen infrage, die von Tumoren induziert werden und auf ihrer Oberfläche häufig TGF- β tragen [Nakamura et al. 2001]. Dentelli et al. konnten diese tumorinfiltrierenden T_{regs} ebenfalls als Produzenten von IL-3 identifizieren [Dentelli et al. 2004]. Unwahrscheinlich hingegen ist die autokrine IL-3-Produktion durch Tumorzellen [Aldinucci et al. 2005].

Bendriss-Vermare et al. beobachteten weiterhin, dass die normalerweise durch den CD40L ausgelöste Th₂-Antwort (vgl. 1.3.1) in Kombination mit einem viralen Stimulus zu Th₁ (Induktion von IFN- γ und Th₁-Chemokinen) verschoben wird [Bendriss-Vermare et al. 2005]. Loskog et al. berichten außerdem von einem Verfahren, in dem sie CD40L über einen Adenoviren-Transfer in die Nähe von Tumoren einbringen konnten. So schafften sie ein Milieu, in dem DCs besser reifen können und eine typische Th₁-Antwort induziert wurde, die vorher nicht möglich war [Loskog et al. 2004]. Meadows et al. diskutieren, dass TGF- β bei einer lokal limitierten, mikrobiellen Infektion eine überschießende Reaktion des Körpers unterbindet [Meadows et al. 2006]. Dies

könnte beispielsweise auf die beobachtete Inhibition des Amplifikators IFN- α zurückzuführen sein. Bei einer invasiven mikrobiellen Infektion werden diese inhibitorischen Eigenschaften durch die Produktion von anderen Zytokinen wie z. B. IL-12, die eine effektive NK-Zellaktivierung und Th₁-Antwort auslösen können, verdrängt. Bei einer invasiven Infektion finden sich an einem Ort viele Immunzellen zusammen, so dass es möglich wäre hier die Bedingungen für die Induktion von IL-12 vorzufinden.

5 Zusammenfassung

Hartmann et al. konnten zeigen, dass plasmazytoide dendritische Zellen (PDCs) nach Tumorinfiltration nur noch zu einer eingeschränkten IFN- α -Produktion fähig sind [Hartmann et al. 2003]. In der vorliegenden Dissertation sollte die Ursache für eine derartige Einschränkung dieser zentralen, antitumoralen Eigenschaft der PDCs ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden zwei typische tumorsezernierte Botenstoffe hinsichtlich ihrer Effekte auf die PDC untersucht: Prostaglandin E₂ (PGE₂) und der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β). Ziel dieser Arbeit war es, deren Einfluss auf die PDC-Funktion zu analysieren, indem Änderungen hinsichtlich der Zytokinsekretion, der Zellaktivierung, der migratorischen Fähigkeiten und daran beteiligter Signaltransduktionswege bestimmt wurden. Insbesondere sollte eine genaue Untersuchung der molekularen Mechanismen erfolgen, welche den Prostaglandin-vermittelten Effekten zugrunde lagen.

Die Untersuchungen ergaben folgende Ergebnisse:

- Überstände von Kopf- und Halstumorzelllinien hemmen nach Stimulation mit CpG-DNA die Synthese von IFN- α durch die PDC. Dieser inhibitorische Effekt kann teilweise durch den COX-Inhibitor Indometacin antagonisiert werden.
- PDCs, die mit dem nicht-steroidalen Antirheumatikum Indometacin inkubiert und mit CpG-DNA stimuliert werden, zeigen eine erhöhte Induktion von IFN- α . Indometacin wirkt demnach über eine Inhibition der autokrinen PGE₂-Synthese positiv auf die Synthese von IFN- α .
- Überstände sowohl von CpG- als auch von nicht CpG-DNA-stimulierten PDCs weisen geringe Konzentrationen an PGE₂ auf, so dass eine autokrine Produktion von PGE₂ durch die PDC belegt wird, die durch die Applikation von CpG-DNA noch gesteigert werden kann.
- Rekombinantes humanes PGE₂ und TGF- β hemmen die Produktion von IFN- α und TNF- α .
- PGE₂ induziert – im Gegensatz zu TGF- β – die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8.
- PGE₂ und TGF- β inhibieren die IFN- α -Produktion der PDCs auch bei deren Stimulation mit anderen TLR-Stimuli wie Loxoribine und R848. Die Aktivierung der PDC über einen TLR-unabhängigen Stimulus bleibt erfolglos.
- PGE₂ induziert die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86, während TGF- β CD80 induziert.

- Die Migration der PDC unter Einfluss von PGE_2 ist verändert. Die Inkubation mit PGE_2 sorgt für eine Aufregulation des CXCR4-Rezeptors und eine verminderte Expression des CCR7-Rezeptors. Dadurch kann die PDC in Tumornähe zurückgehalten werden, ein *homing* in den nächstgelegenen drainierenden Lymphknoten wird behindert.
- Über RT-PCR wird die Expression des Prostanoid-Rezeptors EP_2 nachgewiesen. Die Betrachtung der Modulation der $\text{IFN-}\alpha$ -Sekretion unter Verwendung spezifischer Prostanoid-Agonisten spricht für die Expression weiterer Rezeptoren.
- Als *second messenger* der beobachteten PGE_2 -Effekte kann cAMP identifiziert werden. Forskolin als Adenylatzyklase-Aktivator zeigt die gleichen Effekte in Hinblick auf das Zytokinprofil. Eine darauffolgende, ausschließliche Aktivierung von Proteinkinase-A kann nicht beobachtet werden. Ein früher Calcium-Flux wird ausgeschlossen.
- CpG-DNA-stimulierte PDCs, die zusätzlich mit dem ALK5-Inhibitor SB-431542 inkubiert werden, zeigen eine vermehrte Sekretion von $\text{IFN-}\alpha$. Auch hier kann eine Hemmung der autokrinen $\text{TGF-}\beta$ -Produktion angenommen werden. Die $\text{TGF-}\beta$ -vermittelten Effekte lassen sich jedoch nicht vollständig mit SB-431542 verhindern, so dass es in der PDC Smad-unabhängige Kaskaden in der Vermittlung der $\text{TGF-}\beta$ Effekte geben muss.
- Die nach IL-3-Präinkubation und nachfolgender Stimulation mit CpG-B und CD40L erfolgende Produktion von IL-12p40 und IL-12p70 durch die PDC kann durch $\text{TGF-}\beta$ gesteigert werden. Auch die Verwendung anderer TLR-Stimuli wie Loxoribine, R848 und CpG-A zeigt diesen Effekt.
- PGE_2 hemmt die Induktion von IL-12p40 und IL-12p70.
- Die Depletion von CD19^+ -Zellen und das Aufreinigen der PDC-Population durch einen Zellsorter bestätigen die IL-12p40 und IL-12p70 Sekretion durch die PDC.

Die im Tumormilieu durch PGE_2 und $\text{TGF-}\beta$ ausgelöste Abschwächung der Produktion von $\text{IFN-}\alpha$ durch PDCs stellt einen wichtigen, den antitumoralen Einsatz von CpG-DNA einschränkenden, Faktor dar. Die unter CpG-Therapie angestrebte Induktion relevanter Mengen von $\text{IFN-}\alpha$ ist auf diese Weise in der Nähe von PGE_2 und/oder $\text{TGF-}\beta$ sezernierenden Tumoren deutlich reduziert.

In dieser Arbeit wird zusätzlich zum veränderten Zytokinprofil ein modifiziertes Migrationsverhalten der PDC nachgewiesen. Die Überexpression von PGE_2 und die damit ursächlich zusammenhängende vermehrte Expression des CXCR4-Rezeptors

bedingen eine Retention der PDC in der Peripherie, so dass nachfolgende Immunkaskaden effektiv unterbunden werden. Eine therapeutische Blockade des CXCR4-Rezeptors könnte dieses veränderte Migrationsverhalten verhindern.

Indem erstmalig gezeigt werden konnte, dass die CpG-Therapie an sich eine erhöhte PGE₂-Induktion in PDCs nach sich zieht, kann im Umkehrschluss künftig durch die Kombination der CpG-Therapie mit einem die PGE₂-Synthese hemmenden COX-Inhibitor eine Amplifikation der IFN- α -Synthese und damit eine gesteigerte Effektivität der Therapie ermöglicht werden. Auf diese Weise könnte ebenfalls der bereits autokrin erfolgenden PGE₂-Produktion der PDCs entgegen gewirkt werden. Darüber hinaus erscheint es sinnvoll, PGE₂-Effekte selektiv über die Inhibition spezieller PGE-Synthasen bzw. spezifischer Prostanoid-Rezeptorantagonisten (wie z. B. dem auf der PDC hier erstmalig identifizierten EP₂-Rezeptor) zu hemmen.

Dieses erweiterte Verständnis der komplexen Interaktionen zwischen Tumorgewebe und Immunsystem kann künftig dazu beitragen, die immunologische Krebstherapie zu verbessern.

6 Literaturverzeichnis

- Abramovitz, M., Adam, M., Boie, Y., Carriere, M., Denis, D., Godbout, C., Lamontagne, S., Rochette, C., Sawyer, N., Tremblay, N. M., Belley, M., Gallant, M., Dufresne, C., Gareau, Y., Ruel, R., Juteau, H., Labelle, M., Ouimet, N., and Metters, K. M.: The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim Biophys Acta* 1483: 285-93, 2000
- Aguet, M.: Molecular cloning of interferon receptors: a short review. *Br J Haematol* 79 Suppl 1: 6-8, 1991
- Aldinucci, D., Olivo, K., Lorenzon, D., Poletto, D., Gloghini, A., Carbone, A., and Pinto, A.: The role of interleukin-3 in classical Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 46: 303-11, 2005
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A.: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-8, 2001
- Algarra, I., Garcia-Lora, A., Cabrera, T., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F.: The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother* 53: 904-10, 2004
- Ambrus, J. L., Stoll, H. L., Klein, E. A., Karakousis, C. P., and Stadler, S.: Increased prostaglandin E2 and cAMP phosphodiesterase levels in Kaposi's sarcoma--a virus against host defense mechanism. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 78: 249-52, 1992
- Arsura, M., Wu, M., and Sonenshein, G. E.: TGF beta 1 inhibits NF-kappa B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: transcriptional activation of I kappa B alpha. *Immunity* 5: 31-40, 1996
- Ashkar, A. A., Bauer, S., Mitchell, W. J., Vieira, J., and Rosenthal, K. L.: 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: 8948-56, 2003
- Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmberg, A., and Karin, M.: Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270: 286-90, 1995
- Balch, C. M., Soong, S. J., Murad, T. M., Smith, J. W., Maddox, W. A., and Durant, J. R.: A multifactorial analysis of melanoma. IV. Prognostic factors in 200 melanoma patients with distant metastases (stage III). *J Clin Oncol* 1: 126-34, 1983
- Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., and Lipford, G. B.: Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9237-42, 2001
- Bellocq, A., Antoine, M., Flahault, A., Philippe, C., Crestani, B., Bernaudin, J. F., Mayaud, C., Milleron, B., Baud, L., and Cadranel, J.: Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *Am J Pathol* 152: 83-92, 1998
- Bellone, G., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G., and Rodeck, U.: Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. *J Immunol* 155: 1066-73, 1995
- Bendriss-Vermare, N., Burg, S., Kanzler, H., Chaperot, L., Duhon, T., de Bouteiller, O., D'Agostini, M., Bridon, J. M., Durand, I., Sederstrom, J. M., Chen, W., Plumas, J., Jacob, M. C., Liu, Y. J., Garrone, P., Trinchieri, G., Caux, C., and Briere, F.: Virus overrides the propensity of human CD40L-activated plasmacytoid dendritic cells to produce Th2 mediators through synergistic induction of IFN- γ and Th1 chemokine production. *J Leukoc Biol* 78: 954-66, 2005

- Biron, C. A.: Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* 14: 661-4, 2001
- Blobe, G. C., Schiemann, W. P., and Lodish, H. F.: Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342: 1350-8, 2000
- Bodor, J., Bodorova, J., and Gress, R. E.: Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER. *J Leukoc Biol* 67: 774-9, 2000
- Bodor, J., Spetz, A. L., Strominger, J. L., and Habener, J. F.: cAMP inducibility of transcriptional repressor ICER in developing and mature human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3536-41, 1996
- Braun, M. C. and Kelsall, B. L.: Regulation of interleukin-12 production by G-protein-coupled receptors. *Microbes Infect* 3: 99-107, 2001
- Breyer, R. M., Bagdassarian, C. K., Myers, S. A., and Breyer, M. D.: Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 661-90, 2001
- Burnet, M.: Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1: 779-86, 1957
- Callahan, J. F., Burgess, J. L., Fornwald, J. A., Gaster, L. M., Harling, J. D., Harrington, F. P., Heer, J., Kwon, C., Lehr, R., Mathur, A., Olson, B. A., Weinstock, J., and Laping, N. J.: Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5). *J Med Chem* 45: 999-1001, 2002
- Carmeliet, P. and Jain, R. K.: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-57, 2000
- Carpentier, A. F., Chen, L., Maltonti, F., and Delattre, J. Y.: Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res* 59: 5429-32, 1999
- Carpentier, A. F., Xie, J., Mokhtari, K., and Delattre, J. Y.: Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin Cancer Res* 6: 2469-73, 2000
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M.: Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5: 919-23, 1999
- Chen, W. and Wahl, S. M.: Manipulation of TGF-beta to control autoimmune and chronic inflammatory diseases. *Microbes Infect* 1: 1367-80, 1999
- Chen, Y., Zhang, J., Moore, S. A., Ballas, Z. K., Portanova, J. P., Krieg, A. M., and Berg, D. J.: CpG DNA induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production. *Int Immunol* 13: 1013-20, 2001
- Cheng, Y., Austin, S. C., Rocca, B., Koller, B. H., Coffman, T. M., Grosser, T., Lawson, J. A., and FitzGerald, G. A.: Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science* 296: 539-41, 2002
- Coleman, R. A., Smith, W. L., and Narumiya, S.: International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46: 205-29, 1994
- Coley, W. B.: The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*: 3-11, 1991
- Cox, K., North, M., Burke, M., Singhal, H., Renton, S., Aqel, N., Islam, S., and Knight, S. C.: Plasmacytoid dendritic cells (PDC) are the major DC subset innately producing cytokines in human lymph nodes. *J Leukoc Biol* 78: 1142-52, 2005
- Curiel, T. J., Cheng, P., Mottram, P., Alvarez, X., Moons, L., Evdemon-Hogan, M., Wei, S., Zou, L., Kryczek, I., Hoyle, G., Lackner, A., Carmeliet, P., and Zou, W.: Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res* 64: 5535-8, 2004
- Dalpke, A. H., Zimmermann, S., Albrecht, I., and Heeg, K.: 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: 102-12, 2002

- Darzynkiewicz, Z., Williamson, B., Carswell, E. A., and Old, L. J.: Cell cycle-specific effects of tumor necrosis factor. *Cancer Res* 44: 83-90, 1984
- Davila, E. and Celis, E.: Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity. *J Immunol* 165: 539-47, 2000
- Davis, H. L., Weeratna, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J., and Krieg, A. M.: CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 160: 870-6, 1998
- Dentelli, P., Rosso, A., Calvi, C., Ghiringhello, B., Garbarino, G., Camussi, G., Pegoraro, L., and Brizzi, M. F.: IL-3 affects endothelial cell-mediated smooth muscle cell recruitment by increasing TGF beta activity: potential role in tumor vessel stabilization. *Oncogene* 23: 1681-92, 2004
- de Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A., and Bos, J. L.: Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396: 474-7, 1998
- Derynck, R., Akhurst, R. J., and Balmain, A.: TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29: 117-29, 2001
- Derynck, R., Goeddel, D. V., Ullrich, A., Gutterman, J. U., Williams, R. D., Bringman, T. S., and Berger, W. H.: Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res* 47: 707-12, 1987
- Ding, X. Z., Tong, W. G., and Adrian, T. E.: Blockade of cyclooxygenase-2 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 20: 2625-31, 2000
- Donzella, G. A., Schols, D., Lin, S. W., Este, J. A., Nagashima, K. A., Maddon, P. J., Allaway, G. P., Sakmar, T. P., Henson, G., De Clercq, E., and Moore, J. P.: AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* 4: 72-7, 1998
- Du, C. and Sriram, S.: Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells. *J Leukoc Biol* 64: 92-7, 1998
- Duramad, O., Fearon, K. L., Chan, J. H., Kanzler, H., Marshall, J. D., Coffman, R. L., and Barrat, F. J.: IL-10 regulates plasmacytoid dendritic cell response to CpG-containing immunostimulatory sequences. *Blood* 102: 4487-92, 2003
- Eastcott, J. W., Holmberg, C. J., Dewhirst, F. E., Esch, T. R., Smith, D. J., and Taubman, M. A.: Oligonucleotide containing CpG motifs enhances immune response to mucosally or systemically administered tetanus toxoid. *Vaccine* 19: 1636-42, 2001
- Eisma, R. J., Spiro, J. D., and Kreutzer, D. L.: Role of angiogenic factors: coexpression of interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in patients with head and neck squamous carcinoma. *Laryngoscope* 109: 687-93, 1999
- Feng, C., Beller, E. M., Bagga, S., and Boyce, J. A.: Human mast cells express multiple EP receptors for prostaglandin E2 that differentially modulate activation responses. *Blood* 107: 3243-50, 2006
- Fonteneau, J. F., Gilliet, M., Larsson, M., Dasilva, I., Munz, C., Liu, Y. J., and Bhardwaj, N.: Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 101: 3520-6, 2003
- French, L. E. and Tschopp, J.: Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape. *Semin Cancer Biol* 12: 51-5, 2002
- Fujino, H., Salvi, S., and Regan, J. W.: Differential regulation of phosphorylation of the cAMP response element-binding protein after activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *Mol Pharmacol* 68: 251-9, 2005
- Gabrilovich, D. I., Ciernik, I. F., and Carbone, D. P.: Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. *Cell Immunol* 170: 101-10, 1996

- Gardiner, P. J.: Characterization of prostanoid relaxant/inhibitory receptors (ψ) using a highly selective agonist, TR4979. *Br J Pharmacol* 87: 45-56, 1986
- Geissmann, F., Revy, P., Regnault, A., Lepelletier, Y., Dy, M., Brousse, N., Amigorena, S., Hermine, O., and Durandy, A.: TGF- β 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* 162: 4567-75, 1999
- Gerritsen, M. E., Williams, A. J., Neish, A. S., Moore, S., Shi, Y., and Collins, T.: CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2927-32, 1997
- Gibson, S. J., Lindh, J. M., Riter, T. R., Gleason, R. M., Rogers, L. M., Fuller, A. E., Oesterich, J. L., Gorden, K. B., Qiu, X., McKane, S. W., Noelle, R. J., Miller, R. L., Kedl, R. M., Fitzgerald-Bocarsly, P., Tomai, M. A., and Vasilakos, J. P.: Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol* 218: 74-86, 2002
- Goodwin, J. S. and Ceuppens, J.: Regulation of the immune response by prostaglandins. *J Clin Immunol* 3: 295-315, 1983
- Govinden, R. and Bhoola, K. D.: Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- β . *Pharmacol Ther* 98: 257-65, 2003
- Guba, S. C., Stella, G., Turka, L. A., June, C. H., Thompson, C. B., and Emerson, S. G.: Regulation of interleukin 3 gene induction in normal human T cells. *J Clin Invest* 84: 1701-6, 1989
- Halder, S. K., Beauchamp, R. D., and Datta, P. K.: A specific inhibitor of TGF- β receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers. *Neoplasia* 7: 509-21, 2005
- Halperin, S. A., Van Nest, G., Smith, B., Abtahi, S., Whiley, H., and Eiden, J. J.: 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: 2461-7, 2003
- Hannigan, G. E. and Williams, B. R.: Signal transduction by interferon- α through arachidonic acid metabolism. *Science* 251: 204-7, 1991
- Harada, S., Nagy, J. A., Sullivan, K. A., Thomas, K. A., Endo, N., Rodan, G. A., and Rodan, S. B.: Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest* 93: 2490-6, 1994
- Harizi, H., Juzan, M., Pitard, V., Moreau, J. F., and Gualde, N.: Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol* 168: 2255-63, 2002
- Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., and Phipps, R. P.: Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 23: 144-50, 2002
- Hartmann, E., Wollenberg, B., Rothenfusser, S., Wagner, M., Wellisch, D., Mack, B., Giese, T., Gires, O., Endres, S., and Hartmann, G.: Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 63: 6478-87, 2003a
- Hartmann, G., Battiany, J., Poeck, H., Wagner, M., Kerkmann, M., Lubenow, N., Rothenfusser, S., and Endres, S.: Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 33: 1633-41, 2003b
- Hartmann, G. and Krieg, A. M.: Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 164: 944-53, 2000
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., and Anderson, K. V.: The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52: 269-79, 1988
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A.: The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099-103, 2001

- Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H., and Bauer, S.: The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 33: 2987-97, 2003
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S.: Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526-9, 2004
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S.: Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3: 196-200, 2002
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S.: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-5, 2000
- Hilkens, C. M., Sniijders, A., Vermeulen, H., van der Meide, P. H., Wierenga, E. A., and Kapsenberg, M. L.: Accessory cell-derived IL-12 and prostaglandin E2 determine the IFN-gamma level of activated human CD4+ T cells. *J Immunol* 156: 1722-27, 1996
- Hinz, B., Brune, K., and Pahl, A.: Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E(2), and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 278: 790-6, 2000
- Honda, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Watabe, A., Irie, A., Negishi, M., Narumiya, S., and Ichikawa, A.: Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype. *J Biol Chem* 268: 7759-62, 1993
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougères, A., Endres, S., and Hartmann, G.: Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11: 263-70, 2005
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G.: 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: 4531-7, 2002
- Huang, M., Stolina, M., Sharma, S., Mao, J. T., Zhu, L., Miller, P. W., Wollman, J., Herschman, H., and Dubinett, S. M.: Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res* 58: 1208-16, 1998
- Inman, G. J., Nicolas, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping, N. J., and Hill, C. S.: SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 62: 65-74, 2002a
- Inman, G. J., Nicolas, F. J., and Hill, C. S.: Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell* 10: 283-94, 2002b
- Isaacs, A. and Lindenmann, J.: Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147: 258-67, 1957
- Ishii, K. J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., Sato, S., Yamamoto, M., Uematsu, S., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S.: A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* 7: 40-8, 2006
- Ishii, K. J., Ito, S., Tamura, T., Hemmi, H., Conover, J., Ozato, K., Akira, S., and Klinman, D. M.: CpG-activated Thy1.2+ dendritic cells protect against lethal *Listeria monocytogenes* infection. *Eur J Immunol* 35: 2397-405, 2005

- Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Ikehara, S., Inaba, K., and Fukuhara, S.: Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J Immunol* 166: 2961-9, 2001
- Jiang, H., Colbran, J. L., Francis, S. H., and Corbin, J. D.: Direct evidence for cross-activation of cGMP-dependent protein kinase by cAMP in pig coronary arteries. *J Biol Chem* 267: 1015-9, 1992
- Jonasch, E. and Haluska, F. G.: Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist* 6: 34-55, 2001
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., and Bauer, S.: Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 3: 499, 2002
- Kadowaki, N. and Liu, Y. J.: Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 63: 1126-32, 2002
- Kaisho, T. and Akira, S.: Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* 1589: 1-13, 2002
- Kaminuma, O., Mori, A., Ogawa, K., Kikkawa, H., Nakata, A., Ikezawa, K., and Okudaira, H.: Cyclic AMP suppresses interleukin-5 synthesis by human helper T cells via the downregulation of the calcium mobilization pathway. *Br J Pharmacol* 127: 521-9, 1999
- Kargman, S. L., O'Neill, G. P., Vickers, P. J., Evans, J. F., Mancini, J. A., and Jothy, S.: Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* 55: 2556-9, 1995
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S.: Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23: 19-28, 2005
- Katze, M. G., He, Y., and Gale, M., Jr.: Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2: 675-87, 2002
- Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M. B., and Fauci, A. S.: Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 163: 1037-50, 1986
- Kerkmann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G.: 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: 4465-74, 2003
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., and Arihiro, K.: Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* 66: 5527-36, 2006
- Kirkwood, J.: Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. *Semin Oncol* 29: 18-26, 2002
- Kitadai, Y., Haruma, K., Sumii, K., Yamamoto, S., Ue, T., Yokozaki, H., Yasui, W., Ohmoto, Y., Kajiyama, G., Fidler, I. J., and Tahara, E.: Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am J Pathol* 152: 93-100, 1998
- Kline, J. N., Waldschmidt, T. J., Businga, T. R., Lemish, J. E., Weinstock, J. V., Thorne, P. S., and Krieg, A. M.: Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 160: 2555-9, 1998
- Klinman, D. M., Barnhart, K. M., and Conover, J.: CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine* 17: 19-25, 1999a
- Klinman, D. M., Conover, J., and Coban, C.: Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection. *Infect Immun* 67: 5658-63, 1999b
- Klinman, D. M., Ishii, K. J., Gursel, M., Gursel, I., Takeshita, S., and Takeshita, F.: Immunotherapeutic applications of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Drug News Perspect* 13: 289-96, 2000

- Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J., and Krieg, A. M.: CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2879-83, 1996
- Koch, A. E., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Harlow, L. A., DiPietro, L. A., Elner, V. M., Elner, S. G., and Strieter, R. M.: Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258: 1798-801, 1992
- Krieg, A. M.: CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20: 709-60, 2002
- Krieg, A. M., Love-Homan, L., Yi, A. K., and Harty, J. T.: CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* 161: 2428-34, 1998a
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., and Klinman, D. M.: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-9, 1995
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Schorr, J., and Davis, H. L.: The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol* 6: 23-7, 1998b
- Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z. K., Endres, S., Krieg, A. M., and Hartmann, G.: Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31: 2154-63, 2001a
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A. M., and Hartmann, G.: 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: 3026-37, 2001b
- Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J., and Finberg, R. W.: Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1: 398-401, 2000
- Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C., and Stallings, W. C.: Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 384: 644-8, 1996
- Labayle, D., Fischer, D., Vielh, P., Drouhin, F., Pariente, A., Bories, C., Duhamel, O., Troussset, M., and Attali, P.: Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 101: 635-9, 1991
- Laping, N. J., Grygielko, E., Mathur, A., Butter, S., Bomberger, J., Tweed, C., Martin, W., Fornwald, J., Lehr, R., Harling, J., Gaster, L., Callahan, J. F., and Olson, B. A.: Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol* 62: 58-64, 2002
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., and Tough, D. F.: Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14: 461-70, 2001
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A.: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-83, 1996
- Lennert, K. and Remmele, W.: [Measurement of the cell nucleus in the lymph node cells of man. II. Reticulum cells and endothelial cells.]. *Acta Haematol* 20: 301-17, 1958
- Letterio, J. J. and Roberts, A. B.: Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 16: 137-61, 1998
- Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K., and Flavell, R. A.: Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24: 99-146, 2006

- Linsley, P. S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N. K., and Ledbetter, J. A.: Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 173: 721-30, 1991a
- Linsley, P. S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L. S., Damle, N. K., and Ledbetter, J. A.: CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 174: 561-9, 1991b
- Liu, C. H., Chang, S. H., Narko, K., Trifan, O. C., Wu, M. T., Smith, E., Haudenschild, C., Lane, T. F., and Hla, T.: Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 276: 18563-9, 2001
- Lopez, C., Fitzgerald, P. A., and Siegal, F. P.: Severe acquired immune deficiency syndrome in male homosexuals: diminished capacity to make interferon-alpha in vitro associated with severe opportunistic infections. *J Infect Dis* 148: 962-6, 1983
- Loskog, A., Dzojic, H., Vikman, S., Ninalga, C., Essand, M., Korsgren, O., and Totterman, T. H.: Adenovirus CD40 ligand gene therapy counteracts immune escape mechanisms in the tumor Microenvironment. *J Immunol* 172: 7200-5, 2004
- Luethviksson, B. R. and Gunnlaugsdottir, B.: Transforming growth factor-beta as a regulator of site-specific T-cell inflammatory response. *Scand J Immunol* 58: 129-38, 2003
- Luft, T., Luetjens, P., Hochrein, H., Toy, T., Masterman, K. A., Rizkalla, M., Maliszewski, C., Shortman, K., Cebon, J., and Maraskovsky, E.: IFN-alpha enhances CD40 ligand-mediated activation of immature monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol* 14: 367-80, 2002
- Lyons, R. M., Gentry, L. E., Purchio, A. F., and Moses, H. L.: Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol* 110: 1361-7, 1990
- Marrack, P., Kappler, J., and Mitchell, T.: Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 189: 521-30, 1999
- Marshall, J. D., Fearon, K., Abbate, C., Subramanian, S., Yee, P., Gregorio, J., Coffman, R. L., and Van Nest, G.: Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *J Leukoc Biol* 73: 781-92, 2003
- Marshall, J. D., Heeke, D. S., Abbate, C., Yee, P., and Van Nest, G.: Induction of interferon-gamma from natural killer cells by immunostimulatory CpG DNA is mediated through plasmacytoid-dendritic-cell-produced interferon-alpha and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 117: 38-46, 2006
- Masferrer, J. L., Leahy, K. M., Koki, A. T., Zweifel, B. S., Settle, S. L., Woerner, B. M., Edwards, D. A., Flickinger, A. G., Moore, R. J., and Seibert, K.: Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 60: 1306-11, 2000
- Massague, J.: How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 169-78, 2000
- Massague, J., Blain, S. W., and Lo, R. S.: TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103: 295-309, 2000
- Mazzoni, A., Leifer, C. A., Mullen, G. E., Kennedy, M. N., Klinman, D. M., and Segal, D. M.: Cutting edge: histamine inhibits IFN-alpha release from plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 170: 2269-73, 2003
- McCoy, J. M., Wicks, J. R., and Audoly, L. P.: The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 110: 651-8, 2002
- McIntyre, T. M., Kehry, M. R., and Snapper, C. M.: Novel in vitro model for high-rate IgA class switching. *J Immunol* 154: 3156-61, 1995
- McKenna, K., Beignon, A. S., and Bhardwaj, N.: Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol* 79: 17-27, 2005

- Meadows, S. K., Eriksson, M., Barber, A., and Sentman, C. L.: Human NK cell IFN-gamma production is regulated by endogenous TGF-beta. *Int Immunopharmacol* 6: 1020-8, 2006
- Meja, K. K., Barnes, P. J., and Giembycz, M. A.: Characterization of the prostanoid receptor(s) on human blood monocytes at which prostaglandin E2 inhibits lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor-alpha generation. *Br J Pharmacol* 122: 149-57, 1997
- Mitchell, J. A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R. J., and Vane, J. R.: Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11693-7, 1993
- Mitsuhashi, M., Liu, J., Cao, S., Shi, X., and Ma, X.: Regulation of interleukin-12 gene expression and its anti-tumor activities by prostaglandin E2 derived from mammary carcinomas. *J Leukoc Biol* 76: 322-32, 2004
- Miyazono, K. and Heldin, C. H.: Latent forms of TGF-beta: molecular structure and mechanisms of activation. *Ciba Found Symp* 157: 81-9; discussion 89-92, 1991
- Molina, C. A., Foulkes, N. S., Lalli, E., and Sassone-Corsi, P.: Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75: 875-86, 1993
- Morales, A., Eiding, D., and Bruce, A. W.: Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 116: 180-3, 1976
- Morham, S. G., Langenbach, R., Loftin, C. D., Tiano, H. F., Vouloumanos, N., Jennette, J. C., Mahler, J. F., Kluckman, K. D., Ledford, A., Lee, C. A., and Smithies, O.: Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 83: 473-82, 1995
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E., and Zlotnik, A.: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410: 50-6, 2001
- Munn, D. H., Sharma, M. D., Hou, D., Baban, B., Lee, J. R., Antonia, S. J., Messina, J. L., Chandler, P., Koni, P. A., and Mellor, A. L.: Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 114: 280-90, 2004
- Muraoka, R. S., Dumont, N., Ritter, C. A., Dugger, T. C., Brantley, D. M., Chen, J., Easterly, E., Roebuck, L. R., Ryan, S., Gotwals, P. J., Kotliansky, V., and Arteaga, C. L.: Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *J Clin Invest* 109: 1551-9, 2002
- Mutwiri, G. K., Nichani, A. K., Babiuk, S., and Babiuk, L. A.: Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *J Control Release* 97: 1-17, 2004
- Nakabayashi, T., Sakata, K. M., Sakata, A., Kong, L., Lau, C. A., Letterio, J. J., Vela-Roch, N., Talal, N., and Dang, H.: TGF-beta1 null mutation leads to CD154 upregulated expression in affected tissues. *Inflammation* 25: 69-73, 2001
- Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W.: Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194: 629-44, 2001
- Nauts, H. C. and McLaren, J. R.: Coley toxins--the first century. *Adv Exp Med Biol* 267: 483-500, 1990
- Neumann, M., Grieshammer, T., Chuvpilo, S., Kneitz, B., Lohoff, M., Schimpl, A., Franza, B. R., Jr., and Serfling, E.: RelA/p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein kinase A. *Embo J* 14: 1991-2004, 1995
- Nirodi, C. S., Crews, B. C., Kozak, K. R., Morrow, J. D., and Marnett, L. J.: The glyceryl ester of prostaglandin E2 mobilizes calcium and activates signal transduction in RAW264.7 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1840-5, 2004

- Nishikawa, H., Kato, T., Tawara, I., Saito, K., Ikeda, H., Kuribayashi, K., Allen, P. M., Schreiber, R. D., Sakaguchi, S., Old, L. J., and Shiku, H.: Definition of target antigens for naturally occurring CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 201: 681-6, 2005
- O'Doherty, U., Peng, M., Gezelter, S., Swiggard, W. J., Betjes, M., Bhardwaj, N., and Steinman, R. M.: Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82: 487-93, 1994
- Oh, S. P., Seki, T., Goss, K. A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P. K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S., and Li, E.: Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2626-31, 2000
- Okamoto, M., Kawamata, H., Kawai, K., and Oyasu, R.: Enhancement of transformation in vitro of a nontumorigenic rat urothelial cell line by interleukin 6. *Cancer Res* 55: 4581-5, 1995
- Old, L. J.: Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230: 630-2, 1985
- Ono, K., Akatsu, T., Murakami, T., Nishikawa, M., Yamamoto, M., Kugai, N., Motoyoshi, K., and Nagata, N.: Important role of EP4, a subtype of prostaglandin (PG) E receptor, in osteoclast-like cell formation from mouse bone marrow cells induced by PGE2. *J Endocrinol* 158: R1-5, 1998
- Ortaldo, J. R., Mantovani, A., Hobbs, D., Rubinstein, M., Pestka, S., and Herberman, R. B.: Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes. *Int J Cancer* 31: 285-9, 1983
- Osawa, Y., Iho, S., Takauji, R., Takatsuka, H., Yamamoto, S., Takahashi, T., Horiguchi, S., Urasaki, Y., Matsuki, T., and Fujieda, S.: Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 177: 4841-52, 2006
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., and Aderem, A.: The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13766-71, 2000
- Pacanowski, J., Kahi, S., Baillet, M., Lebon, P., Deveau, C., Goujard, C., Meyer, L., Oksenhendler, E., Sinet, M., and Hosmalin, A.: Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* 98: 3016-21, 2001
- Penna, G., Sozzani, S., and Adorini, L.: Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 167: 1862-6, 2001
- Penna, G., Vulcano, M., Sozzani, S., and Adorini, L.: Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 63: 1164-71, 2002
- Piek, E., Heldin, C. H., and Ten Dijke, P.: Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *Faseb J* 13: 2105-24, 1999
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-8, 1998
- Rahman, A., Anwar, K. N., Minhajuddin, M., Bijli, K. M., Javaid, K., True, A. L., and Malik, A. B.: cAMP targeting of p38 MAP kinase inhibits thrombin-induced NF-kappaB activation and ICAM-1 expression in endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L1017-24, 2004
- Regan, J. W., Bailey, T. J., Pepperl, D. J., Pierce, K. L., Bogardus, A. M., Donello, J. E., Fairbairn, C. E., Kedzie, K. M., Woodward, D. F., and Gil, D. W.: Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Mol Pharmacol* 46: 213-20, 1994

- Reissmann, E., Jornvall, H., Blokzijl, A., Andersson, O., Chang, C., Minchiotti, G., Persico, M. G., Ibanez, C. F., and Brivanlou, A. H.: The orphan receptor ALK7 and the Activin receptor ALK4 mediate signaling by Nodal proteins during vertebrate development. *Genes Dev* 15: 2010-22, 2001
- Rigas, B., Goldman, I. S., and Levine, L.: Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* 122: 518-23, 1993
- Rissoan, M. C., Duhon, T., Bridon, J. M., Bendriss-Vermare, N., Peronne, C., de Saint Vis, B., Briere, F., and Bates, E. E.: Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 100: 3295-303, 2002
- Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., and Liu, Y. J.: Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283: 1183-6, 1999
- Rolland, P. H., Martin, P. M., Jacquemier, J., Rolland, A. M., and Toga, M.: Prostaglandin production and metabolism in human breast cancer. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 6: 575-80, 1980
- Ronnblom, L. and Alm, G. V.: An etiopathogenic role for the type I IFN system in SLE. *Trends Immunol* 22: 427-31, 2001
- Roth, S., Gong, W., and Gressner, A. M.: Expression of different isoforms of TGF-beta and the latent TGF-beta binding protein (LTBP) by rat Kupffer cells. *J Hepatol* 29: 915-22, 1998
- Rothenfusser, S., Hornung, V., Krug, A., Towarowski, A., Krieg, A. M., Endres, S., and Hartmann, G.: Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha-beta. *Eur J Immunol* 31: 3525-34, 2001
- Rozic, J. G., Chakraborty, C., and Lala, P. K.: Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer* 93: 497-506, 2001
- Sakaguchi, K., Kitano, M., Nishimura, M., Senoh, T., Ohta, T., Terao, M., Shinji, N., Koide, N., and Tsuji, T.: Serum level of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and the expression of TGF-beta receptor type II in peripheral blood mononuclear cells in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 51: 1780-3, 2004
- Sakamoto, K., Masuda, T., Mita, S., Ishiko, T., Nakashima, Y., Arakawa, H., Egami, H., Harada, S., Matsushima, K., and Ogawa, M.: Interleukin-8 is constitutively and commonly produced by various human carcinoma cell lines. *Int J Clin Lab Res* 22: 216-9, 1992
- Salio, M., Palmowski, M. J., Atzberger, A., Hermans, I. F., and Cerundolo, V.: CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *J Exp Med* 199: 567-79, 2004
- Sandhu, J. K., Privora, H. F., Wenckebach, G., and Birnboim, H. C.: Neutrophils, nitric oxide synthase, and mutations in the mutatest murine tumor model. *Am J Pathol* 156: 509-18, 2000
- Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R. L., Hashiramoto, A., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Kato, H., Kondo, M., and Hla, T.: Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 55: 3785-9, 1995
- Sarrazin, P., Hackett, J. A., Fortier, I., Gallant, M. A., and de Brum-Fernandes, A.: Role of EP3 and EP4 prostaglandin receptors in reorganization of the cytoskeleton in mature human osteoclasts. *J Rheumatol* 31: 1598-606, 2004
- Schmitz, T., Dallot, E., Leroy, M. J., Breuille-Fouche, M., Ferre, F., and Cabrol, D.: EP(4) receptors mediate prostaglandin E(2)-stimulated glycosaminoglycan synthesis in human cervical fibroblasts in culture. *Mol Hum Reprod* 7: 397-402, 2001

- Schulz, O., Edwards, A. D., Schito, M., Aliberti, J., Manickasingham, S., Sher, A., and Reis e Sousa, C.: CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 13: 453-62, 2000
- Schwartz, R. H.: A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248: 1349-56, 1990
- Schwartz, Z., Gilley, R. M., Sylvia, V. L., Dean, D. D., and Boyan, B. D.: The effect of prostaglandin E2 on costochondral chondrocyte differentiation is mediated by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase C. *Endocrinology* 139: 1825-34, 1998
- Sears, M. R., Burrows, B., Flannery, E. M., Herbison, G. P., Hewitt, C. J., and Holdaway, M. D.: Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N Engl J Med* 325: 1067-71, 1991
- Serkkola, E. and Hurme, M.: Activation of NF-kappa B by cAMP in human myeloid cells. *FEBS Lett* 334: 327-30, 1993
- Sharma, S., Stolina, M., Yang, S. C., Baratelli, F., Lin, J. F., Atianzar, K., Luo, J., Zhu, L., Lin, Y., Huang, M., Dohadwala, M., Batra, R. K., and Dubinett, S. M.: Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clin Cancer Res* 9: 961-8, 2003
- Shiff, S. J. and Rigas, B.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer: evolving concepts of their chemopreventive actions. *Gastroenterology* 113: 1992-8, 1997
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J.: The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284: 1835-7, 1999
- Siegal, F. P., Lopez, C., Fitzgerald, P. A., Shah, K., Baron, P., Leiderman, I. Z., Imperato, D., and Landesman, S.: Opportunistic infections in acquired immune deficiency syndrome result from synergistic defects of both the natural and adaptive components of cellular immunity. *J Clin Invest* 78: 115-23, 1986
- Singh, R. K., Varney, M. L., Bucana, C. D., and Johansson, S. L.: Expression of interleukin-8 in primary and metastatic malignant melanoma of the skin. *Melanoma Res* 9: 383-7, 1999
- Smalley, W. E. and DuBois, R. N.: Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 39: 1-20, 1997
- Smith, W. L., Marnett, L. J., and DeWitt, D. L.: Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther* 49: 153-79, 1991
- Son, Y., Ito, T., Ozaki, Y., Tanijiri, T., Yokoi, T., Nakamura, K., Takebayashi, M., Amakawa, R., and Fukuhara, S.: Prostaglandin E is a negative regulator on human plasmacytoid dendritic cells. *Immunology* 119: 36-42, 2006
- Soumelis, V., Scott, I., Gheyas, F., Bouhour, D., Cozon, G., Cotte, L., Huang, L., Levy, J. A., and Liu, Y. J.: Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 98: 906-12, 2001
- Stackpole, C. W., Cremona, P., Leonard, C., and Stremmel, P.: Antigenic modulation as a mechanism for tumor escape from immune destruction: identification of modulation-positive and modulation-negative mouse lymphomas with xenoantisera to murine leukemia virus gp70. *J Immunol* 125: 1715-23, 1980
- Stolina, M., Sharma, S., Lin, Y., Dohadwala, M., Gardner, B., Luo, J., Zhu, L., Kronenberg, M., Miller, P. W., Portanova, J., Lee, J. C., and Dubinett, S. M.: Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol* 164: 361-70, 2000
- Sur, S., Wild, J. S., Choudhury, B. K., Sur, N., Alam, R., and Klinman, D. M.: Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 162: 6284-93, 1999

- Taipale, J., Saharinen, J., and Keski-Oja, J.: Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. *Adv Cancer Res* 75: 87-134, 1998
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S.: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11: 443-51, 1999a
- Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P. F., and Akira, S.: 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: 554-7, 2000
- Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Takeda, K., and Akira, S.: TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 231: 59-65, 1999b
- Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T., and et al.: Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 72: 955-62, 1984
- Tokunaga, T., Yamamoto, T., and Yamamoto, S.: How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn J Infect Dis* 52: 1-11, 1999
- Toutirais, O., Chartier, P., Dubois, D., Bouet, F., Leveque, J., Catros-Quemener, V., and Genetet, N.: Constitutive expression of TGF-beta1, interleukin-6 and interleukin-8 by tumor cells as a major component of immune escape in human ovarian carcinoma. *Eur Cytokine Netw* 14: 246-55, 2003
- Trinchieri, G.: Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13: 251-76, 1995
- Tsuji, M., Kawano, S., and DuBois, R. N.: Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3336-40, 1997
- Tsuji, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., and DuBois, R. N.: Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93: 705-16, 1998
- Ulloa, L., Doody, J., and Massague, J.: Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 397: 710-3, 1999
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Smith, K. D., and Aderem, A.: Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14459-63, 1999
- Ushikubi, F., Hirata, M., and Narumiya, S.: Molecular biology of prostanoid receptors: an overview. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12: 343-59, 1995
- Vallin, H., Blomberg, S., Alm, G. V., Cederblad, B., and Ronnblom, L.: 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, 1999a
- Vallin, H., Perers, A., Alm, G. V., and Ronnblom, L.: Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 163: 6306-13, 1999b
- Vermi, W., Bonecchi, R., Facchetti, F., Bianchi, D., Sozzani, S., Festa, S., Berenzi, A., Cella, M., and Colonna, M.: Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol* 200: 255-68, 2003

- Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H. L., and Krieg, A. M.: Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 34: 251-62, 2004
- Voorzanger, N., Touitou, R., Garcia, E., Delecluse, H. J., Rousset, F., Joab, I., Favrot, M. C., and Blay, J. Y.: Interleukin (IL)-10 and IL-6 are produced in vivo by non-Hodgkin's lymphoma cells and act as cooperative growth factors. *Cancer Res* 56: 5499-505, 1996
- Wagner, M., Poeck, H., Jahrsdoerfer, B., Rothenfusser, S., Prell, D., Bohle, B., Tuma, E., Giese, T., Ellwart, J. W., Endres, S., and Hartmann, G.: IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA. *J Immunol* 172: 954-63, 2004
- Wakefield, L. M. and Roberts, A. B.: TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 12: 22-9, 2002
- Yamamoto, S., Yamamoto, T., Shimada, S., Kuramoto, E., Yano, O., Kataoka, T., and Tokunaga, T.: DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol* 36: 983-97, 1992
- Yi, A. K., Hornbeck, P., Lafrenz, D. E., and Krieg, A. M.: CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM-induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of c-myc and bcl-xL. *J Immunol* 157: 4918-25, 1996a
- Yi, A. K., Klinman, D. M., Martin, T. L., Matson, S., and Krieg, A. M.: Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J Immunol* 157: 5394-402, 1996b
- Ytterberg, S. R. and Schnitzer, T. J.: Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 401-6, 1982
- Zhang, A., Wang, M. H., Dong, Z., and Yang, T.: Prostaglandin E2 Is a Potent Inhibitor of Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Interaction with Hepatocyte Growth Factor. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., and Sprent, J.: Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8: 591-9, 1998
- Zimmermann, S., Egeter, O., Hausmann, S., Lipford, G. B., Rocken, M., Wagner, H., and Heeg, K.: CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 160: 3627-30, 1998
- Zou, W., Borvak, J., Wei, S., Isaeva, T., Curiel, D. T., and Curiel, T. J.: Reciprocal regulation of plasmacytoid dendritic cells and monocytes during viral infection. *Eur J Immunol* 31: 3833-9, 2001a
- Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L'Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gassel, I., Gordon, A., Pustilnik, T., Curiel, D. T., Galanaud, P., Capron, F., Emilie, D., and Curiel, T. J.: Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7: 1339-46, 2001b

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

ALK	activin like kinase
AP-1	Adapterprotein-1
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
Aqua ad inj.	Wasser für Injektionszwecke
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASS	Acetylsalicylsäure
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BHK	Baby hamster kidney
BSA	Bovines Serum-Albumin
cAMP	cyclisches Adenosin-monophosphat
CD	cluster of differentiation
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CG	Cytosin-Guanin
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
COX	Cyclooxygenase
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HEV	Hohe endotheliale Venolen
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HSA	Humanes Serum-Albumin
ICER	inducible cAMP early repressor
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	inhibitory κ B kinase
I κ B α	inhibitor of NF κ B α
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-3 Phosphat
IPC	Interferon-produzierende Zelle
IRAK 1/ 4	IL-1R-assozierte Kinase 1/ 4
IRF 7	IFN regulatory factor 7
ISRE	IFN-stimulated response element
LAP	latency-associated peptide
LP	Lipopeptid
LPS	Lipopolysaccharid
LRRs	leucine rich repeats
LTBP	latent TGF- β binding protein
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mda5	differentiation-associated gene 5
MDC	Myeloide dendritische Zelle
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)

Mio	Million(en)
MIP-1 β	macrophage inflammatory protein 1 β
MMP	Matrixmetalloproteasen
mRNA	messenger RNA
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PG	Prostaglandin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PKA	Proteinkinase-A
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
PO	Phosphodiester
PRR	pattern-recognition-Rezeptor
PS	Phosphatidylserin
PTO	Phosphorothioat
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SBE	smad binding elements
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SDF-1	stromal derived factor-1
SEM	Standard error of mean
Smad	similar to mothers against decapentaplegic
STAT 1/2	signal transducers and activators of transcription 1 and 2
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor beta 1
TH	T-Helfer
TIR	Toll/ IL-1R-Domäne
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TOPRO-3	To-Pro-3-Iodid
TRAF 6	TNFR-assoziierter Faktor 6
T _{regs}	regulatorische T-Zellen
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN- β
VEGF	vascular endothelial growth factor

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit werden wie folgt veröffentlicht:

Originalarbeiten

2007

1. Schäfer M., Bekeredjian-Ding I., Schneider P., Gires O., Hartmann E., Schnurr M., Endres S., Wollenberg B. und Hartmann G.:

Tumor-derived Prostaglandin E₂ and TGF-beta synergize to inhibit PDC-derived IFN-alpha release. 2007
Manuskript in Vorbereitung

2. Schäfer M., Bekeredjian-Ding I., Endres S. und Hartmann G.:

CD40L reverses TGF-beta-induced IL-12 suppression in TLR-stimulated plasmacytoid dendritic cells
Manuskript in Vorbereitung

Vorträge

1. Schäfer M.:

PGE₂ und TGF-β vermindern die Sensitivität der plasmazytoiden dendritischen Zelle auf den TLR-9 Liganden CpG
Symposium Gentianum, Wildbad Kreuth, D, 14.-15.01.2005

Posterpräsentationen

1. Schäfer M., Bekeredjian-Ding I., Schneider P., Gires O., Hartmann E., Schnurr M., Endres S., Wollenberg B. und Hartmann G.:

PGE₂ and TGF-β decrease the sensitivity of plasmacytoid dendritic cells towards stimulation with TLR Ligands
1st Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, New York, USA, 15.-18.09.2005

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Gunther Hartmann für die Überlassung des Themas und seine wertvolle, inhaltliche Diskussionsbereitschaft. Seine Begeisterung für die Wissenschaft hat mich stets motiviert. Es war eine besondere Erfahrung für mich, meine wissenschaftlichen Ergebnisse auf internationalen Kongressen vorstellen zu dürfen.

Großer Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Stefan Endres für sein persönliches Engagement und sein Interesse für alle Mitarbeiter der Abteilung.

Besonderer Dank gebührt meiner Betreuerin Frau Dr. Isabelle Bekeredjian-Ding für ihre Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, ihre stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und Geduld sowie ihre freundschaftliche Unterstützung in allen Lebenslagen.

Allen anderen Mitarbeitern der Abteilung, besonders Dr. Christine Richter (meiner Schwester im Geiste...), Dr. Veit Hornung, Dr. Martin Schlee, Susanne Roth, Rosemarie Kiefl, Andrea Mühlberger sowie Susanne Wenk möchte ich recht herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und kollegiale Zusammenarbeit danken.

Ich bedanke mich meinen Kollaborationspartnern Frau Prof. Dr. Barbara Wollenberg (Lübeck) und Herrn Dr. Olivier Gires (München).

Ulrika Hinkel danke ich für ihre fernmündliche Motivation, ihre ausdauernde Geduld und ihre unschätzbare Freundschaft.

Schließlich möchte ich meinen Eltern Eva und Johannes Schäfer für ihre liebevolle Unterstützung danken. Sie haben mir und meinen Geschwistern Nina und Philipp, auf die ich sehr stolz bin, stets alles ermöglicht und uns unermüdlich gefördert.

Lebenslauf

Meike Schäfer, geboren am 14. März 1977 in Essen

Akademische Ausbildung und Berufserfahrung

Jan 2004 – heute	Medizinische Klinik Innenstadt, München Doktorarbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie Leiter: Prof. Dr. Stefan Endres Arbeitsgruppe Therapeutische Oligonukleotide Leiter: Prof. Dr. Gunther Hartmann
Jan 2004 – heute	Betreuung des klinisch-pharmakologischen Konsiliardienstes, Med. Klinik München
Juli 2004 – heute	Hans-Mielich Apotheke, München Nacht - und Samstagsdienst
Okt 2003 – Juni 2004	Fernuniversität Hagen Intensivkurs Betriebswirtschaftslehre
Nov 2002 – Dez 2003	Liebig-Apotheke, München
Jan 2002 – Okt 2002	Kaiser-Friedrich Apotheke, Mülheim an der Ruhr
Nov 2001	Approbation zur Apothekerin, Gesamtnote: 2,2
Mai 2001 – Okt 2001	Malteser-Apotheke, Duisburg Praktisches Jahr
Nov 2000 – April 2001	Grünenthal GmbH, Aachen Praktisches Jahr
Aug 1999 – April 2000	Faculté de Pharmacie, Université Paris XI Auslandssemester
Okt 1996 – Okt 2000	Philipps-Universität, Marburg Studium der Pharmazie

Schulische Ausbildung

1987 – 1996	Gymnasium an den Buchen, Mülheim an der Ruhr Abitur, Gesamtnote: 1,8
1983 – 1987	Grundschule Eduardstraße, Mülheim an der Ruhr

Stipendien

Jan 2006 – April 2006	Stipendium des DFG-Graduiertenkollegs 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“
Sept 2005	Reisestipendium der GlaxoSmithKline Stiftung
Aug 1999 – April 2000	ERASMUS-Stipendium Auslandsaufenthalt