

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Die Interaktion der plasmazytoiden dendritischen Zelle mit dem
CD8+ T-Lymphozyten**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Domenik Prell

aus München

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Hartmann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Barbara Adler
Priv. Doz. Dr. Reinhard Obst

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. V. Hornung
Dr. human. Biol A. Sarris

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACP, FRBR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.02.2014

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das humane Immunsystem	1
1.1.1. Komponenten des humanen Immunsystems	1
1.1.2. Erkennungsmechanismen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems	2
1.1.3. Die Familie der Toll-Like-Rezeptoren	4
1.2. Mechanismen der angeborenen Immunantwort	8
1.2.1. Natürliche Killerzellen	8
1.2.2. Interferone – lösliche Stoffe der angeborenen Immunabwehr	9
1.3. Mechanismen der adaptiven Immunantwort	9
1.3.1. Die $\alpha\beta$ T-Zellen	9
1.4. Dendritische Zellen	10
1.4.1. Die myeloide dendritische Zelle	11
1.4.2. Die plasmazytoide dendritische Zelle	11
1.5. CpG-Oligodesoxynukleotide	12
1.5.1. Vom bakteriellen Lysat zum CpG-Oligodesoxynukleotide	12
1.5.2. Die immunstimulatorische Wirkung der unterschiedlichen CpG-ODNs	14
1.5.3. Die Erkennung des CpG-Motivs über einen Toll-like Rezeptor	14
1.5.4. CpG ODNs als mögliche Adjuvans in der Medizin	15
1.5.5. Einsatz von CpG-ODNs in der Therapie von Tumoren	16
1.6. Fragestellung	18
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1. Reagenzien, Chemikalien und Geräte	19
2.1.1. Geräte	19
2.1.2. Chemikalien	19
2.1.3. Radioaktive Chemikalien	20
2.1.4. Reagenziensätze	20
2.1.6. Materialien für die Zellkultur	20
2.1.7. Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzien	21
2.1.8. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen	22
2.1.9. Antikörper	22
2.1.10. Oligodesoxynukleotide	23
2.1.11. Zelllinien	24
2.2. Zellulär-immunologische Methoden	24
2.2.1. Zellkultur	24
2.2.1.1. Allgemeine Kulturbedingungen	24
2.2.1.2. Kultivierung der Tumorzelllinien	24
2.2.1.3. Bestrahlung der Tumorzelllinien	25
2.2.1.4. Kultivierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes	25

2.2.1.5. Bestrahlung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes	25
2.2.1.6. Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl	25
2.2.2. Durchflusszytometrie	26
2.2.2.1. Allgemeines Funktionsprinzip	26
2.2.2.2. Bestimmung der Oberflächeneigenschaften einer Zelle	27
2.2.2.3. Bestimmung von intrazellulären Molekülen mittels FACS Technologie	28
2.2.2.4. Messung der Zytotoxizität mittels Durchflusszytometrie	28
2.2.2.5. Messung der Zellproliferation mittels FACS Technologie	28
2.2.3. Aufreinigung der einzelnen Zellpopulationen	29
2.2.3.2. Aufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung	30
2.2.3.3. Kultivierung der Zellpopulationen	31
2.2.4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	32
2.2.4.1. Allgemeines Funktionsprinzip	32
2.2.4.2. Bestimmung der Proteinmenge mittels eines ELISAs	32
2.3. Statistische Analyse	33
3. ERGEBNISSE	34
3.1. Die plasmazytoide dendritische Zelle induziert eine Antigen-unabhängige IFN-Induktion in (anti-CD3-stimulierten) CD8 positiven T –Zellen	34
3.1.2. Die (CpG-) TLR9-vermittelte Aktivierung von PDCs führt zu einer deutlichen Steigerung der Antigen-unabhängigen Kostimulation von CD8 positiven T-Zellen	35
3.1.3. Der Vergleich von MDCs und PDCs zeigt eine deutliche Überlegenheit von PDCs in der Antigen-unabhängigen Kostimulation von CD8 positiven T-Zellen	38
3.2. PDCs steigern die Zytotoxizität von aktivierten CD8+ T-Zellen	39
3.2.1 CpG-aktivierte PDCs führen zu einer deutlichen Steigerung der Granzyme B Produktion in aktivierten CD8+ T-Zellen	40
3.2.2. Nur die aktivierte PDC ist in der Lage Granzyme B in CD8 positiven T-Zellen zu induzieren	41
3.2.3. Die lytische Aktivität von aktivierten CD8 positiven T-Zellen wird durch CpG-stimulierte PDCs gesteigert	41
3.2.4. PDCs steigern in aktivierten CD8+ T-Lymphozyten deutlicher als MDCs	44
3.3. Die PDC-vermittelte, Antigen-unabhängige Aktivierung von CD8 positiven T-Zellen wird durch direkten Zellkontakt vermittelt	46
3.3.1. Die Inhibierung von IL-12, IL-15, IL-18 und IFN zeigt keine Hemmung der PDC-vermittelten Ko-Stimulation von Aktivierung CD8 positiven T-Zellen	47
3.3.2. Die Induktion von INF- γ in CD8 positiven T-Zellen durch PDCs wird über Zell zu Zell Kontakt vermittelt	50
3.3.3. Die Inhibition von CD28 und OX40L führen zu einer deutlichen Reduktion der Antigen-unabhängigen Aktivierung von CD8 positiven T-Zellen durch PDCs	53
4. DISKUSSION	
4.1. Übersicht über die experimentellen Befunde	55

4.2.	Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur	57
4.2.1.	Die Stimulation des CD8 positiven T-Lymphozyten durch mit CpG-ODNs aktivierte PDCs.	57
4.2.2.	Mechanismen der Aktivierung von CD8+ T-Lymphozyten durch PDCs	61
	a) Lösliche Faktoren	61
	b) Zellkontakt-abhängige Faktoren	63
4.2.3.	Der Unterschied in der Aktivierung CD8 positiven T-Lymphozyten im Hinblick auf die aktivierende Zelle.	67
4.2.4.	Modell einer Kostimulation CD8 positiver T-Lymphozyten durch über CpG-ODN aktivierte PDCs	68
4.3.	Ausblick	69
5. ZUSAMMENFASSUNG		72
6. LITERATURVERZEICHNIS		75
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME		92
DANKSAGUNG		94
LEBENSLAUF		95

1. Einleitung

1.1. Das humane Immunsystem

Der menschliche Körper ist kontinuierlich einer Vielzahl von Angriffen durch Krankheitserreger und andere exogene Noxen ausgesetzt. Aber nicht nur externe Faktoren sind eine Bedrohung für die Integrität des menschlichen Körpers, sondern auch interne Faktoren, wie z.B. durch Transformationen veränderte Körperzellen, können eine Gefahr für das Wohl der eigenen Gesundheit darstellen. Deshalb haben schon entwicklungsgeschichtlich „einfache“ Organismen, wie z.B. Einzeller, ein Immunsystem entwickelt (vom lateinischen *immunis* für „unversehrt“, „unberührt“), das durch das Zusammenspiel eines komplexen Netzwerkes in der Lage ist, bedrohende Einflüsse für die Integrität einer Zelle oder eines gesamten Organismus zu erkennen und zu neutralisieren. Eine zentrale Rolle kommt hierbei der Fähigkeit des Immunsystems zu, zwischen körpereigenen Stoffen und Bestandteilen von körperfremden Organismen wie Bakterien, Parasiten, Pilzen, Viren, aber auch Tumorzellen zu unterscheiden. Einzeller und einfache Organismen verfügen hierbei über relativ rudimentäre Abwehrmechanismen, die unspezifisch gegen fremde Organismen vorgehen. Diese Mechanismen entsprechen in etwa der *angeborenen Immunabwehr* und sind auch heute noch in höheren Lebewesen vorzufinden. Zusätzlich entwickelte sich jedoch bei den Wirbeltieren eine äußerst komplexe und anpassungsfähige *adaptive Immunabwehr*.

1.1.1. Komponenten des humanen Immunsystems

Wie bereits oben aufgeführt, lässt sich das Immunsystem grob in zwei große Teile splitten, die sich durch ihre Effektormechanismen, den Zeitpunkt ihres Eingreifens bei einer Infektion, ihre Systeme der Fremderkennung wie auch ihren genetischen Bauplan klar unterscheiden lassen. Die *erworbene* oder auch *adaptive Immunabwehr* zeichnet sich hierbei durch eine wesentlich höhere Spezifität gegenüber dem Erreger aus. Von zentraler Rolle sind hierbei die beiden Klassen von Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten), die auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl von hochspezifischen Antigen-erkennenden Molekülen – ihre Rezeptoren – tragen. Das Besondere ist, dass jeder Lymphozyt nur in der Lage ist, ein für sich spezifisches Antigen-erkennendes Molekül zu synthetisieren. Um ein möglichst großes Spektrum möglicher Pathogene abdecken zu können, bedienen sich sowohl B- als auch T-Lymphozyten bei der Synthese des für sich spezifischen Antigen-erkennenden Moleküls der

sogenannten somatischen Rekombination. Hierbei werden die Antigen-erkennende, Molekül kodierenden Gensegmente umgelagert, und somit eine größere Vielfalt an möglichen Zielstrukturen erreicht. Durch diese Genumlagerung erhöht sich die Anzahl erkennbarer Pathogene um ein Vielfaches im Vergleich zu einer einfachen „ein Gen ein Protein“ Kodierung. Somit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einem körperfremden Antigen einen „passenden“ Lymphozyten gibt. Es ergibt sich hieraus ein extrem großes Repertoire an spezifischen Rezeptoren, die auf einzelnen B- und T-Zellen exprimiert werden. Erkennt nun einer dieser hoch spezifischen Lymphozyten ein für sich passendes Antigen, so kann es zu einer Aktivierung kommen, die sich unter anderem auch in einer Proliferation, Synthese und Sekretion von für die Zelle spezifischen Stoffen zeigt. Durch diese sogenannte klonale Expansion ist im Anschluss eine hoch spezifische Abwehr eines Pathogens möglich. Eine derartige klonale Vermehrung und Ausdifferenzierung eines spezifischen Lymphozyten benötigt in der Regel jedoch eine Zeitspanne von mehr als 96 Stunden, so dass vom eigentlichen Eindringen eines Pathogens bis zu dessen effektiven Bekämpfung eine Lücke entsteht. Diese Lücke zu „überbrücken“ ist neben der Steuerung der adaptiven Immunität eine wichtige Aufgabe der *angeborenen Immunabwehr*. Diese erfüllt hierbei mehrere Rollen. Auf der einen Seite ist sie in der Lage, bereits zu einem frühen Zeitpunkt, etwaige eindringende „externe Angreifer“ zu erkennen und durch Ausschüttung von Entzündungsmediatoren in „Schach zu halten“. Andererseits ist es Aufgabe des angeborenen Immunsystems, Antigene zu prozessieren und zu präsentieren, damit die *adaptive Immunabwehr* eine spezifische Abwehrreaktion generieren kann. Das *angeborene*, wie auch das *adaptive Immunsystem* stellen somit zwei Komponenten eines verzahnten Systems dar, dass die Aufgabe erfüllt, den menschlichen Körper vor externen Gefahrenquellen zu beschützen.

1.1.2. Erkennungsmechanismen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems

Der Hauptunterschied zwischen *angeborenem* und *adaptivem* Immunsystem sind die Mechanismen, die zur Generierung der Antigen-erkennenden Strukturen der jeweiligen Immunsystemkomponenten führen.

Die Ausbildung des *angeborenen* Immunsystems ist ein gutes Beispiel für das darwinsche Evolutionsprinzip. Es ist in einer rudimentären Form bereits bei Einzellern nachweisbar (z.B. Amöben) und bietet dort bereits einen einfachen Schutz gegenüber externen Angriffen. Die genaue Struktur der hierfür verwendeten Rezeptoren ist Keimbahn-kodiert. Die Spezifität eines Rezeptors ist somit genetisch determiniert und wird vererbt. Dieses System besitzt

sowohl Vor- als auch Nachteile. Auf der einen Seite werden so Rezeptoren, die sich im Laufe der Evolution als besonders nützlich im Kampf gegen mikrobielle Erreger gezeigt haben, von einer Generation an die nächste weiter gegeben. Auf der anderen Seite ist jedoch das Genom von seiner Größe her limitiert. Man vermutet, dass nur ca. 0,1 bis 1 Prozent der 20.000 kodierenden Gene des menschlichen Genoms mit dem Immunsystem in Verbindung gebracht werden können. Jedoch muss hierbei beachtet werden, dass das Projekt zur Entschlüsselung des menschlichen Genoms noch nicht vollendet ist.

Dem gegenüber bedient sich das *adaptive* Immunsystem der T- und B-Zell-Rezeptoren, die während der Lymphozytenreifung durch Rekombination der Rezeptor-kodierenden Gene somatisch gebildet werden. Jeder Lymphozyt besitzt somit nur einen einzigen, strukturell spezifischen Rezeptor. Die eigentliche Struktur des Rezeptors ist damit nicht genau in der Keimbahn festgelegt und so nicht auf ein spezifisches Antigen festgelegt. Aus diesem zufällig generierten Pool an Lymphozyten werden nun im Laufe des Lebens, durch positive wie auch negative Selektionsmechanismen, diejenigen ausgewählt, die auf ein für sie spezifisches Antigen treffen und in der Folge klonal expandieren. Man geht davon aus, dass auf diesem Wege im Laufe des Lebens durch die somatische Rekombination ca. 10^{14} bis 10^{19} unterschiedliche T-Zellrezeptoren (TZR) und Immunglobuline (Ig) gebildet werden. Der Nachteil liegt bei dieser hoch spezifischen Generierung der Rezeptoren jedoch darin, dass die Generierung rein zufällig geschieht, und dass diese hohe Diversifizität nicht durch die Keimbahn weiter gegeben werden kann. Somit müssen diese von Generation zu Generation neu entwickelt werden.

Die Zahl der Erkennungsmechanismen ist dennoch im Vergleich zu der großen Anzahl der heterogenen und einem ständigen Selektionsdruck unterliegenden Mikroorganismen stark begrenzt. Deshalb haben sich die sogenannten *pattern-recognition*-Rezeptoren (PRRs) herausgebildet. Hierbei handelt es sich um Rezeptoren, die einige hoch-konservative Strukturen, die sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), erkennen, die den meisten Mikroorganismen gemeinsam sind. Obwohl diese Strukturen eine äußerst heterogene Gruppe darstellen, zeichnen sie sich jedoch durch zahlreiche gemeinsame Eigenschaften aus:

- (1) PAMPs kommen im Wirtsorganismus nicht vor und sind spezifisch für mikrobielle Erreger.
- (2) Die durch das *angeborene* Immunsystem erkannten Strukturen sind essenziell für das Überleben des Mikroorganismus und können daher, trotz Selektionsdruck des Wirts, nicht mutieren.
- (3) Bei den erkannten Strukturen handelt es sich in der Regel um invariante Strukturen, die von einer großen Zahl von pathogenen Erregern geteilt werden.

Die PRRs bilden somit eine zentrale Rolle in der Erkennung pathogener Keime durch das angeborene Immunsystem. Im Gegensatz zum *adaptiven* Immunsystem werden diese Rezeptoren nicht nur auf einer spezifischen Zelle exprimiert, sondern finden sich auf einer Vielzahl von unterschiedlichen Effektorzellen, insbesondere auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen (DC), sowie auf B-Zellen. Hierbei exprimieren alle Zellen einer bestimmten Subpopulation Rezeptoren einer identischen Spezifität. Wie man heute weiß, erfüllen unter anderem Mitglieder der Familie der Lektin-Rezeptoren [Banchereau, 2000], der Scavenger-Rezeptoren [Peiser, 2002], der *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) [Barton, 2002a], der NOD-Rezeptoren [Inohara, 2003] und der RIG-I-like Helikases [Yoneyama, 2004] die Kriterien oben beschriebener PRRs.

1.1.3. Die Familie der *Toll-Like-Rezeptoren*

Bereits 1992 postulierte Charles Janeway die Existenz bestimmter PRRs. Neben der eigentlichen Aufgabe dieser Rezeptoren, nämlich der Initiation der raschen Komponente der angeborenen Immunantwort, sah er eine weitere wichtige Aufgabe in der Einleitung und Modulation der adaptiven Immunantwort [Janeway et al. 1992].

Die ersten experimentellen Bestätigungen dieser These über derartige Erkennungsmechanismen gelangen durch die Aufdeckung der Struktur, wie auch der Rolle des *Toll*-Rezeptors für die angeborene Immunität der *Drosophila* [Lemaitre, 1996; Williams, 1997]. Kurz darauf gelang die Entdeckung eines murinen *Toll*-Rezeptor-Homologs, das als verantwortliches Gen für eine Immunantwort nach Präsentation von Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Membran gramnegativer Bakterien, in zwei natürlichen Maus-Mutanten identifiziert werden konnte [Poltorak, 1998; Hoshino, 1999; Qureshi, 1999].

1996 konnten Lemaitre et al. die Bedeutung des *Toll*-Rezeptors in der Abwehr von Pilzinfektionen bei *Drosophila* zeigen [Lemaitre, 1996]. Des weiteren erkannte man ein Jahr später, dass ein *Toll*-verwandtes Protein namens *18-wheeler* eine zentrale Rolle in der Abwehr bakterieller Angriffe bei *Drosophila* einnimmt [Williams, 1997]. Ein Abgleich mit der humanen Gendatenbank enthüllte eine dem *Drosophila-Toll*-Gen verwandte Sequenz im menschlichen Genom, die später TLR-1 benannt wurde [Nomura, 1994; Taguchi, 1996]. Weiterhin fanden Janeway et al. auf der Suche nach Erkennungsstrukturen für das angeborene Immunsystem des Menschen, einige Strukturen, die den Proteinen des *Toll*-Rezeptors der *Drosophila* sehr ähnelten - hTLR4 [Medzhitov, 1997b]. Die ersten funktionellen Untersuchungen bekräftigten ein weiteres Mal die These, die Charles Janeway bereits 1992

aufgestellt hatte. Sie zeigten die Wichtigkeit für die Aktivierung des angeborenen, sowie des adaptiven Immunsystems.

Als Poltorak et al. 1998 zeigen konnten, dass Mäuse mit einer Mutation des TLR4-Gens nicht auf LPS-Stimulation reagierten, war der eindeutige Beweis erbracht, dass TLR4 einer der PRRs schlechthin darstellte [Poltorak, 1998]. Ähnliche Beobachtungen machten auch andere Arbeitsgruppen [Hoshino, 1999; Qureshi, 1999].

Bis heute sind in der Maus und im Menschen 12 bzw. 10 *Toll-Like-Rezeptoren* (TLR) bekannt, wobei TLR 1-10 sowohl bei der Maus, als auch beim Menschen zu finden sind. Der genetische Code für TLR 11 findet sich ebenfalls im murinen und humanen Genom, jedoch findet sich im menschlichen Genom ein Stop-Codon [Zang, 2004], so dass dieser beim Menschen nicht exprimiert wird. Für alle diese TLRs wurden bisher Agonisten gefunden, wobei die meisten eines mikrobiellen Ursprungs sind. Außerdem lässt sich das Spektrum der erkannten Strukturen durch Rezeptoren-Heterodimerisierung unter einander um ein vielfaches erhöhen [Ozinsky, 2000]. So verfügt z.B. TLR 2 über ein sehr breites Spektrum an unterschiedlichen mikrobiellen Zielstrukturen. Dies wird dadurch erreicht, dass sich TLR 2 mit TLR 1 oder TLR 6 zusammenlagern kann.

Im Jahr 2000 konnte jedoch gezeigt werden, dass TLRs nicht nur auf exogene mikrobielle Proteine reagieren, sondern auch auf endogene Stoffe, die beispielsweise aus Zellen bei deren Zerstörung frei gesetzt werden. Hierunter findet man Hitzeschockproteine [Ohashi, 2000], Bestandteile der extrazellulären Matrix wie z.B. Fibronectin [Okamura, 2001], aber auch Bestandteile des Zellkerns [Leadbetter, 2002]. Ein Begriff der sich für diese endogenen Liganden der PRRs konstituiert hat ist DAMPs, was in Analogie zu PAMPs für *danger associated molecular patterns* steht.

Tabelle 1 gibt einen aktuellen Überblick über die verschiedenen Liganden, die bis heute bekannt sind [Kiyoshi und Shizuo, 2005]

TLR	Adapterprotein	PAMP	Herkunft	Referenz
TLR1	MyD88	kooperiert mit TLR2		
TLR2	MyD88 und evtl. Mal	Lipoproteine	Gram-positive Bakterien	[Takeuchi, 1999a]
		Zyomosan	Hefen	[Ozinsky, 2000]
		Macrophage-activating lipopeptide 2 (MALP-2)	Mykoplasmen	[Takeuchi, 2000]
		Lipoarabinomannan	Mykobakterien	[Underhill, 1999]

		(LAM)		
TLR3	TRIF	Doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA)	Viren	[Alexopoulou, 2001]
TLR4	Mal mit MyD88 / TRAM mit TRIF	LPS	Gram-negative Bakterien	[Poltorak, 1998; Hoshino, 1999]
		Protein F	RSV	[Kurt-Jones, 2000]
		Hsp 60	Wirt	[Ohashi, 2000]
		Hyaluronan	Wirt	[Termeer, 2002]
		Fibronectin	Wirt	[Okamura, 2001]
TLR5	MyD88	Flagellin	Bakterien	[Hayashi, 2001]
TLR6	MyD88	kooperiert mit TLR2		
TLR7	MyD88	Guanosin-Analoga	nicht bekannt	[Hemmi, 2002]
		Einzelsträngige und doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA)	Viren	[Heil, 2004]
TLR8	MyD88	Guanosin-Analoga	nicht bekannt	[Jurk, 2002]
		Einzelsträngige Ribonukleinsäure (RNA)	Viren	[Heil, 2004]
TLR9	MyD88	CpG-Motive	Bakterien, Viren	[Hemmi, 2000]
TLR10	MyD88	nicht bekannt	nicht bekannt	
TLR11	MyD88	TgPRF	Bakterien	[Yarovinsky, 2005]
TLR12	MyD88	TgPRF	Bakterien	

Tabelle 1 Humane *Toll-like-Rezeptoren* und ihre Liganden

Die Aktivierung von TLRs durch mikrobielle Stimulation initiiert die Expression von verschiedenen Genen, die an einer immunologischen Antwort beteiligt sind [Akira, 2004]. Einige TLRs bilden hierfür Heterodimere aus wie z.B. TLR 2 mit TLR1 und TLR 6, während andere Homodimere ausbilden. Diese Ausbildung eines Dimers führt zur Aktivierung einer Signaltransduktion. Es zeigte sich, dass allen TLRs die Verwendung des *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) als Adapterprotein zur Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen gemeinsam war [Hayashi, 2001 und Hemmi, 2002]. Obwohl sich alle TLRs dieses Signaltransduktionsweges bedienen, induzieren unterschiedliche TLRs durch Ihre Aktivierung unterschiedliche Zytokine. Dies ist unter anderem dadurch bedingt, dass TLRs auf unterschiedlichen Zellpopulationen exprimiert werden, die unterschiedliche Zytokinmuster

a priori produzieren. Andererseits rekrutieren die unterschiedlichen TLRs unterschiedliche Adapterproteine und schlagen somit spezifische Signaltransduktionswege ein. So zeigte sich früh nach der Entdeckung von MyD88, dass es auch einen weiteren, MyD88-unabhängigen Aktivierungsweg gibt. In MyD88-defizienten Mäusen ist zwar die MyD88-assoziierte Zytokinproduktion aufgehoben, dennoch gelang der Nachweis von Interferon-induzierbaren Genen und der Entstehung von DCs nach einer Stimulation von TLR4 [Kawai, 1999; Kaisho, 2001; Kawai, 2001]. Es stellte sich heraus, dass für diese MyD88-unabhängige Aktivierung das Molekül TRIF (*TIR domain-containing adapter inducing IFN- β*) verantwortlich war [Yamamoto, 2002b; Oshiumi, 2003]. Während alle TLRs MyD88 aktivieren, initiiert TLR3 seine Signaltransduktionskaskade ausschließlich über TRIF. TLR4 löst eine sehr komplexe Signaltransduktionskaskade aus, wobei einerseits über das Adapterprotein Mal MyD88 aktiviert wird und andererseits über TRAM TRIF aktiviert wird (siehe Abb. 1).

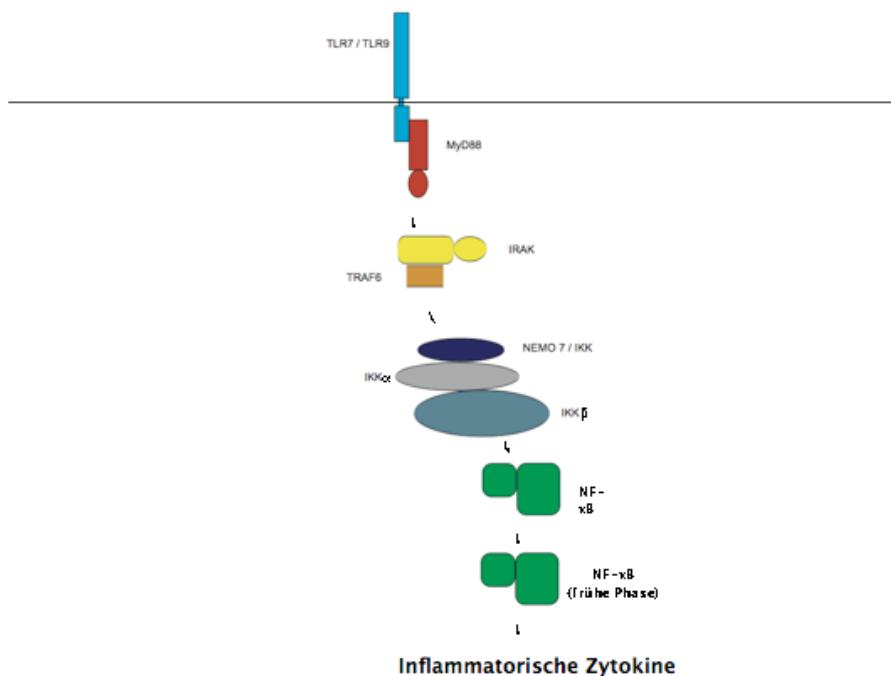


Abb. 1: TLR9 Signalübertragungsweg:

TLR9 rekrutiert über das Adapterprotein MyD88 die IL-1R-assoziierte Kinase 1 und 4 (IRAK1,4), welche den TNFR-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) phosphoryliert und somit aktiviert. In Abhängigkeit von TRAF6 kommt es über mehrere Zwischenschritte zu einer Translokation von NF- κ B in den Nukleus und somit einer Transkription von NF- κ B-abhängigen inflammatorischen Zytokinen.

1.2. Mechanismen der angeborenen Immunantwort

1.2.1. Natürliche Killerzellen

Den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) kommt in der angeborenen Immunabwehr eine zentrale Rolle zu, da diese in der Lage sind infizierte oder auch Tumorzellen zu eliminieren, ohne zuvor mit einem Krankheitserreger selbst in Kontakt gestanden zu haben. Diese Eigenschaft brachte ihnen 1975 bei ihrer Entdeckung auch ihren Namen ein und blieb lange Zeit auch das einzige Klassifikationskriterium.

1991 konnte von Mingari gezeigt werden, dass NK- und T-Zellen gemeinsame Vorläuferzellen im Knochenmark haben. Morphologisch unterscheiden sich jedoch natürliche Killerzellen deutlich von T-Lymphozyten. So tragen diese nicht den für T-Zellen typischen CD3-Komplex, zeigen aber eine Expression der Oberflächenmarker CD56 und CD16, womit eine Unterscheidung zu den übrigen Lymphozyten möglich ist.

Ähnlich den zytotoxischen T-Zellen liegt ihr Wirkspektrum in der Produktion von Zytokinen, sowie einer direkten, gegen eine Zielzelle gerichteten Zytotoxizität. Da diese Zelle jedoch keinen CD3-Komplex besitzt, erfolgt die eigentliche Aktivierung über einen der T-Zelle ähnlichen und einen komplett unterschiedlichen Weg.

Trifft eine NK-Zelle auf eine mit Antikörper-markierte Zielzelle, so kann sie den konstanten Abschnitt des IgG-Antikörpers über die auf ihr vorkommenden Fc γ -Rezeptoren erkennen und binden. Hierdurch kommt es zu einer, vom T-Lymphozyten bekannten, Antikörper-vermittelten zellgebundenen Zytotoxizität (ADCC = antibody dependent cellular cytotoxicity).

Einen vollkommen anderen Weg beschreibt der, in den 1980er Jahren von dem schwedischen Immunologen Klas Kärre entdeckte, Mechanismus des "Fehlenden Selbst" oder auch „missing self“. Hierbei bindet die NK-Zelle mittels einer Vielzahl von *killer-activating receptors* und *killer-inhibitory receptors* (KIRs) potentielle Zielzellen. Bindet nun eine NK-Zelle mittels eines *killer-activating receptors* an eine Zelle, kommt es zur Aktivierung der zytotoxischen Mechanismen der natürlichen Killerzelle. Im Normalfall wird diese Aktivierung jedoch durch eine Interaktion der *killer-inhibitory receptors* (KIRs) mit MHC-I-Molekülen der potentiellen Zielzelle unterbunden. Kommt es also nicht zu dieser Interaktion des *killer-inhibitory receptors* (KIR) mit dem MHC-I-Molekül, so wird die Zielzelle lysiert. Dieser Aktivierungmechanismus spielt insbesondere bei viral infizierten und tumorös veränderten Zellen eine wichtige Rolle, da es bei diesen häufig zu einem Verlust oder einer verminderten Expression des MHC-I-Komplexes kommt.

1.2.2. *Interferone – lösliche Stoffe der angeborenen Immunabwehr*

Das Interferon (IFN) erhielt seinen Namen, als man entdeckte, dass es bei Zugabe dieses Proteins zu viral infizierten Zellen zu einer Hemmung der viralen Replikation (lat.: *interferre*) kam. Seit der Entdeckung 1957 durch Isaacs fanden sich immer neue Vertreter, so dass man mittlerweile von einer Protein-Familie spricht. Diese große Familie, die aus IFN- α , - β , IFN- γ und IFN- ω besteht, wird im Hinblick auf die Ziel-Rezeptoren, in zwei weitere Subgruppen, das IFN Typ I und das IFN Typ II, unterteilt. IFN- γ ist bisher als einziger Vertreter des IFN Typ II bekannt. Es unterscheidet sich sowohl in seiner Form, als auch in seiner Funktion grundsätzlich vom IFN-Typ I. Dieses hat seine Hauptaufgabe vor allem bei der Immunantwort im Rahmen viralen Infektionen und aktiviert eine Vielzahl von Effektorzellen der angeborenen-, wie auch adaptiven Immunität.

1.3. Mechanismen der adaptiven Immunantwort

1.3.1. *Die $\alpha\beta$ T-Zellen*

Ungefähr 20 Prozent der im Blut vorkommenden Leukozyten werden durch die inhomogene Gruppe der Lymphozyten gebildet. Innerhalb dieser Gruppe stellen den größten Anteil von ca. 70% die $\alpha\beta$ T-Zellen. Die T-Zellen haben ihren Namen durch die, nach ihrer Entstehung im Knochenmark, im Thymus ablaufende Ausreifung. Charakteristisch für diese Zellart ist das Vorkommen eines *T-Zell-Rezeptors (TCR)* mit dem jede Zelle in der Lage ist ein spezifisches Antigen nach dem Schloss-Schlüssel Prinzip zu erkennen. Anders als zum Beispiel der B-Lymphozyt ist der T-Lymphozyt jedoch nicht in der Lage freie Antigene zu erkennen. Die Antigene müssen hierfür in Form kurzkettiger Peptide in einem Komplex mit den sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplexen (major histocompatibility complex, MHC) präsentiert werden. Je nachdem durch welches MHC Molekül das Antigen präsentiert wird, unterscheidet man zwei große Hauptgruppen der T-Lymphozyten. CD4+ T-Lymphozyten erkennen Antigene im Komplex mit dem MHC-II-Molekülen, während CD8+ T-Lymphozyten dies im Komplex mit MHC-I-Molekülen tun.

Dieser Stimulus alleine reicht jedoch noch nicht zur vollständigen Aktivierung eines T-Lymphozyten aus. Zusätzlich zu der Aktivierung über den TCR benötigen die Zellen weitere Stimulation durch ko-stimulatorische Signale. Fehlen diese, kommt es bei den CD4+ Helferzellen nur zu einer unvollständigen Aktivierung oder sogar dem Stadium einer T-Zell-Anergie.

Die zusätzlichen ko-stimulatorischen Signale werden normalerweise durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) über Moleküle der B7-Familie (unter anderem CD80 und CD86) bereitgestellt. Im Anschluss an diese erste Aktivierung kommt es unter dem Einfluss des Zytokins IL-2 zu einer Proliferation und Differenzierung des aktivierte T-Lymphozyten. Diese "geprimten" $\alpha\beta$ T-Lymphozyten sind von nun an in der Lage bei Antigenkontakt leichter aktiviert zu werden. Je nachdem über welchen Rezeptor der T-Lymphozyt das für sich spezifische Antigen erkennt, kommt es zu unterschiedlichen Reaktionen. CD8+ T-Lymphozyten produzieren in der Folge einer Aktivierung bestimmte Zytokine oder lysieren die Antigen-tragenden Zellen. CD4+ Lymphozyten führen eher zu einer Aktivierung von B-Lymphozyten.

1.4. Dendritische Zellen

Eine für die T-Lymphozyten-Aktivierung äußerst wichtige Zelle sind die dendritischen Zellen (DCs). Es handelt sich hierbei um eine heterogene Gruppe von Zellen, die aufgrund ihrer Zellform, wie auch ihrer funktionellen Charakteristika zu dieser Gruppe zusammengefasst werden.

Erst die Präsentation eines Antigens über das MHC-Molekül, in Verbindung mit den durch die DC zusätzlich exprimierten ko-stimulatorischen Molekülen, macht eine effektive T-Zell-Aktivierung möglich. Somit spielt die DC in der adaptierten Immunantwort eine zentrale Rolle. Um diese Aufgabe erfüllen zu können, residieren DCs in der Peripherie, wie z.B. in den oberen Hautschichten. In diesem Zustand phagozytieren und prozessieren DCs Antigene aus ihrer Umgebung. Kommt es gleichzeitig zu einer Aktivierung ihrer PRRs, wandern DCs in ihre drainierenden Lymphknoten und präsentieren das prozessierte Antigen an T-Zellen, die durch den Lymphknoten zirkulieren. Auf ihrem Weg in die sekundär-lymphatischen Organe reifen die dendritischen Zellen unter dem Einfluss verschiedener koordinierter Aktionen von Chemokinen und ihren Rezeptoren aus. Kommt es zu dem Kontakt mit einer Antigen-spezifischen T-Zelle kann diese nun geprämt werden, sich klonal expandieren und in eine Effektorzelle umwandeln.

Obwohl bis heute ein morphologisches Kriterium zur Einteilung einer Zelle in die Gruppe der DCs fehlt, lassen sich phänotypisch im peripheren Blut des Menschen doch zwei Subpopulationen – die myeloide unreife CD11c-positive DC (MDC) und die CD11c-negative plasmzytoid DC (PDC) – unterscheiden [O'Doherty, 1994].

1.4.1. Die myeloide dendritische Zelle

Bei den myeloiden unreifen CD11c-positiven DCs (MDCs) handelt es sich um, aus Knochenmark stammenden, Leukozyten, die praktisch in allen menschlichen Organen vorkommen. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Antigenaufnahme, der Prozessierung und der anschließenden Präsentation gegenüber T-Lymphozyten.

Im Anschluss an die oben beschriebene Wanderung in die sekundär-lymphatischen Organe zeigen die DCs alle nötigen ko-stimulatorischen Signale, die sie, u.a. über Moleküle der B7-Familie (u. a. CD80 und CD86), zur vollständigen T-Zell-Aktivierung befähigen. Da jede Aufnahme eines Fremd-Antigens auch mit der Aufnahme von Eigenantigenen verbunden ist, müssen diese DCs jedoch auch in der Lage sein Toleranz zu induzieren. Steinmann et al. konnten 2003 zeigen, dass diese Fähigkeit zur Induktion einer Immunität oder einer Toleranz vom Aktivierungsgrad einer DC abhängt. Während voll aktivierte DCs eine hohe Menge an MHC-II- und ko-stimulatorischen Molekülen aufweisen, zeigen die ebenfalls reifen, aber inaktiven DCs (*quiescent DC*) nur kleine Mengen an MHC-II-Molekülen und erzeugen hierdurch eine Toleranz.

Wie bereits oben beschrieben, präsentieren DCs exogene Antigene als prozessierte Proteine in einem Komplex mit dem MHC-II-Protein. Körpereigene, also endogene Antigene oder aber auch Virusbestandteile werden normalerweise im Komplex mit MHC-I präsentiert. Kurts und Bels konnten 2001 und 2002 zeigen, dass es der DC jedoch teilweise möglich ist, diese strenge Aufteilung zu umgehen, und endogene Antigene ebenfalls in einem Komplex mit MHC-II präsentiert werden können. Hierdurch ist es einer DC möglich eine zytotoxische Antwort auf z.B. eine Virusinfektion zu induzieren ohne, dass die eigentlich DC hierfür durch den Virus befallen sein muss.

Außerdem sind DCs in der Lage verschiedene „Gefahrensignale“ wie mikrobielle Stimuli wie z.B. CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN), doppelsträngige virale Ribonukleinsäure (RNA), LPS oder Hitze-Schock-Proteine mittels PRR zu erkennen.

Durch die Möglichkeit einer MHC-Komplex-gebundenen T-Zell-Aktivierung, wie auch einer Erkennung der oben beschriebenen Gefahrensignale, stellt die DC somit eine Schnittstelle zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem da.

1.4.2. Die plasmazytoide dendritische Zelle

Erst vor einigen Jahren wurde die Zelle charakterisiert, die im Immunsystem auf die Erkennung von Viren spezialisiert ist. Lange hatte man angenommen, dass die meisten

humanen Blutzellen in der Lage sind, bei einer viralen Infektion IFN-Typ I zu produzieren. Es wurde jedoch bereits in den siebziger Jahren postuliert, dass es einen Hauptzelltyp geben muss, der auf die Produktion von IFN-Typ I spezialisiert ist. 1996 wurde schließlich eine ausführliche Phänotypisierung dieser Interferon-produzierenden Zelle (IPC) veröffentlicht. Siegal und Liu konnten 1999 zeigen, dass die IPC identisch war mit der 1997 von Olweus et al. beschriebenen „plasmazytoiden dendritischen Zelle“ (PDC). Die Arbeitsgruppe von Olweus et al. hatte zuvor gezeigt, dass diese plasmazytoiden Zellen durch die Expression der IL-3-Rezeptorkette-alpha (CD123) identifiziert werden können und somit den Begriff des „plasmazytoiden Monozyten“ ablösen.

1999 konnten Cella und Colonna diese Beobachtung bestätigen und zusätzlich zeigen, dass die PDC in der Lage war in den Lymphknoten *in-situ* Typ-I Interferon zu bilden.

Die PDC unterscheidet sich grundlegend von myeloiden dendritischen Zellen, denn im Gegensatz zu diesen, ist sie nur begrenzt in der Lage, Phagozytose zu betreiben und somit Antigen zu präsentieren. Bislang ist nur eine einzige Situation beschrieben, in der die PDC exogene Antigene in einem MHC-Molekül-Komplex präsentiert. Diese Situation tritt dann ein, wenn die PDC selbst durch einen Virus infiziert ist [Fonteneau, 2003].

1.5. CpG-Oligodesoxynukleotide – eine Gefahrensignal für das Immunsystem

1.5.1. Vom bakteriellen Lysat zum CpG-Oligodesoxynukleotide

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts machte der New Yorker Chirurg Dr. William Coley bei einem Vergleich der Erfolgsraten seiner Operationen mit den Operationen in den Jahren zuvor die erstaunliche Entdeckung, dass der Erfolg bei der Behandlung von Tumoren nach Einführung von Desinfektionsmitteln und dem damit verbundenen Rückgang von postoperativen Wundinfektionen deutlich zurückgegangen war. Coley entwickelte daher die Theorie, dass es durch die Infektion zu einer Aktivierung des Immunsystems kam, die den Tumor bekämpft. Deshalb entwickelte er ein Lysat aus *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens*, das er peri- und intratumoral spritzte. Mit dieser Art der Therapie konnte er erstaunliche Heilungsraten von über 10 % erreichen. 1901 geriet dieser Therapieansatz mit der Entwicklung der Strahlentherapie und den damit verbundenen Therapieerfolgen ins Hintertreffen. Außerdem war es anderen Ärzten nicht gelungen Coleys Beobachtungen zu reproduzieren.

Beinahe 100 Jahre später konnte Tokunaga anhand verschiedener Fraktionen eines bakteriellen Lysates von *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), das seit 1976 erfolgreich bei der Therapie des Blasenkarzinoms eingesetzt wird [Morales, 1976], zeigen, dass die mykobakterielle Desoxyribonukleinsäure (DNA) für die immunstimulatorische Wirkung verantwortlich ist [Tokunaga, 1984; Tokunaga, 1999]. 1992 publizierte die Arbeitsgruppe um Yamamoto, dass dieser Effekt nicht nur, wie zuerst vermutet, durch bakterielle DNA erzeugt wurde, sondern auch durch einzelsträngige DNA-Moleküle, die bestimmte Sequenzen enthalten, hervorgerufen werden kann [Yamamoto, 1992].

1995 konnten Arthur Krieg und seine Arbeitsgruppe diese immunstimulatorische Wirkung der bakteriellen DNA auf ein bestimmtes Motiv der Basen Cytidin und Guanosin, das *sog. CpG-Motiv* (p steht hierbei für eine Phosphat-Bindung), zurückführen [Krieg, 1995]. Diese Motive bestehen dabei mindestens aus einer Folge von sechs Basen. Die darauf von Krieg et al. durchgeführten Experimente zur genaueren Charakterisierung dieser Oligodesoxynukleotide (ODN) zeigten, dass sowohl die Länge - die optimale Länge für einen immunstimulatorischen Effekt liegt bei zwanzig Basen – als auch die, das CpG-Motiv flankierenden, Basen einen Einfluss auf ihre immunstimulierende Wirkung hatten [Krieg, 1995].

Gerade diese, das CpG-Motiv flankierende Basen sind ein grundlegender Unterschied zwischen bakterieller und vertebraler DNA. Versuche ergaben, dass die, das CpG-Motiv in Vertebraten-DNA flankierenden Basen, eine wesentlich geringere immunstimulatorische Wirkung aufwiesen. Zusätzlich zeigte sich, dass in circa 80% der Fälle die Vertebraten-DNA in ihren CpG-Motiven eine Methylierung am Cytosin besitzt. Zudem sind CpG-Motive allgemein circa zwanzigfach seltener in vertebraler DNA als in bakterieller DNA. Diese Beobachtungen blieben jedoch nicht nur auf bakterielle DNA beschränkt. Sun konnte 1996 zeigen, dass derartige Unterschiede beispielsweise auch bei Insekten-DNA oder Nematoden-DNA zu finden sind [Sun, 1996; Sun, 1997].

Somit entwickelte sich die Hypothese, dass es sich bei der Erkennung von CpG-Motiven, die die oben genannten Charakteristika aufwiesen, um einen hoch spezifischen Abwehrmechanismus handelt, der es Vertebraten erlaubt, zwischen eigener von fremder DNA zu unterscheiden.

Auf dieser Hypothese aufbauend gelang es, synthetische Oligonukleotide für klinische Studien und zur Forschung zu entwickeln, deren Halbwertszeit jedoch aufgrund des raschen Abbaus durch Nukleasen sehr gering war. Deshalb wurde mittels Phosphorothioat-Modifikation des DNA-Gerüsts ein Weg gefunden, der dies verhinderte. Hierbei wird das nicht an der Bindung beteiligte Sauerstoffatom der Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom

ersetzt. Als weiterer positiver Effekt zeigte sich eine zusätzliche Steigerung der immunmodulatorischen Potenz des CpG-ODNs [Krieg, 1996].

1.5.2. Die immunstimulatorische Wirkung der unterschiedlichen CpG-ODNs

Bisher sind drei unterschiedliche Typen von CpG-ODNs bekannt, die sich, aufgrund der das CpG-Motiv flankierenden Basen, in der Wirkung bezüglich der Zielzellen unterscheiden.

1. Das CpG-Typ-A-ODN zeichnet sich durch Poly-Guanosin-Enden sowie eine Palindromsequenz aus, die sich um ein zentrales CpG-Motiv gruppiert und ihrerseits weitere CpG-Motive enthält. Dieses CpG-Typ-A-ODN ist in der Lage in PDCs große Mengen an IFN-Typ I zu induzieren, während die Wirkung auf B-Zellen nur gering ausgeprägt ist. Hartman et al. vermuteten, dass es durch die Poly-Guanosin-Enden, wie auch die Palindromsequenz, zu einer Anlagerung der ODNs kommt, so dass diese von den PDCs als virusartig erkannt werden. Ein Prototyp für dieses CpG-ODN ist das CpG-ODN 2216.
2. Das CpG-Typ-B-ODN ist ebenfalls in der Lage die PDC zu einer Aktivierung und Ausreifung zu bringen, jedoch kommt es trotz des „optimalen“ humanen CpG-Motivs „GTCGTT“ nur zu einer geringen IFN- α Induktion. Die eigentliche Zielzelle für das CpG-Typ-B-ODN ist die B-Zelle, bei der es eine Proliferation sowie eine Sekretion hoher Mengen an Interleukin-10 (IL-10) und IL-6 bewirkt, welches für den späteren Übergang in die IgM produzierende B-Zelle benötigt wird. Zusätzlich zeigte sich ein deutlicher Anstieg der für die Lymphozyten-Aktivierung notwendigen kostimulatorischen Rezeptoren. Außerdem kommt es in Verbindung mit CD40-Ligand zu einer vermehrten Bildung von IL-12 und damit zu einer IL-12-abhängigen TH1 Antwort. Der klassische Prototyp für diese CpG-ODN Klasse ist das CpG-ODN 2006.
3. Das relativ neue CpG-Typ-C-ODN vereint die Eigenschaften der beiden zuvor beschriebenen CpG-ODNs. Charakterisiert werden sie durch ein „TCGTCG“-Motiv am 5'-Ende, sowie eine zentrale Palindrom-Sequenz, wie sie bei einem CpG-Typ A-ODN vorkommt. Aufgrund dieses Aufbaus kann die CpG-ODN-Klasse sowohl eine IFN- α Sekretion in PDCs induzieren, wie auch B-Zellen aktivieren.

1.5.3. Die Erkennung des CpG-Motivs über einen Toll-like Rezeptor

Lange Zeit herrschte über den Mechanismus, der für die Erkennung der CpG-Motive verantwortlich ist, Unklarheit. Bereits 1994 konnte Zhao et al. zeigen, dass fast alle Zellen in

der Lage sind CpG-ODNs sequenzunspezifisch an ihrer Oberfläche zu binden. 1998 wurde von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt, dass für die Erkennung eines CpG-ODNs eine Aufnahme in ein endosomales Kompartiment sowie eine Azidifizierung erforderlich ist [Yi, 1998]. Außerdem konnte der Effekt z.B. durch Chloroquin, das ein Inhibitor für die endosomale Azidifizierung darstellt, blockiert werden [Macfarlane, 1998]. Dennoch gelang es nicht den eigentlichen Mechanismus der CpG-ODN Erkennung zu identifizieren.

Der Durchbruch gelang, als 2000 die Beteiligung von MyD88 und TRAF6 bei der Signaltransduktion der CpG-ODNs nachgewiesen wurde [Hacker, 2000]. Hemmi et al. konnten dann mittels TLR-Knock-out-Mäusen nachweisen, dass TLR9 der eigentliche Rezeptor für CpG-ODNs ist, da die Gabe von CpG-DNA in TLR9-defizienten Mäusen keine inflammatorische Reaktion mehr auslöste [Hemmi, 2000]. Die so im murinen System gewonnenen Ergebnisse konnten in den folgenden Monaten auch im humanen System bestätigt werden. Es zeigte sich jedoch, dass im Gegensatz zum murinen System, bei dem auch Monozyten und Makrophagen TLR9 tragen, im humanen System einzig B-Zellen und PDCs durch CpG-ODNs stimulierbar sind [Krug, 2001; Hornung, 2002].

Außerdem weisen die bei der Maus verwendeten CpG-ODNs, beim Menschen eine schwächere stimulatorische Wirkung auf. Im Jahr 2000 gelang Hartmann et al. mit dem Hexamer 5' GTCGTT 3' die Identifizierung des optimalen humanen CpG-Motivs [Hartmann, 2000].

Lange Zeit wurde auch über eine direkte Stimulation anderer Zellen durch CpG-ODNs kontrovers diskutiert. Bendigs et al. postulierten 1999 einen ko-stimulatorische Effekt von CpG-ODNs bei T-Zellen, deren TZR zuvor durch ein spezifisches Antigen stimuliert wurde [Bendigs, 1999]. Auch andere Arbeitsgruppen beschrieben eine direkte Stimulation der T-Zelle durch ODN [Iho, 1999]. Die Messung der Expression von TLR 1-10 über *Real-Time-PCR* zeigte jedoch fast keine Expression von TLR9 auf Monozyten, NK-Zellen und T-Lymphozyten [Hornung, 2002].

Ferner passte gut zu den am Anfang beschriebenen Beobachtungen, dass Ahmad-Nejad et al. 2002 zeigen konnte, dass TLR9 in den endosomalen Kompartimenten lokalisiert ist [Ahmad-Nejad, 2002]

1.5.4. CpG ODNs als mögliche Adjuvans in der Medizin

CpG ODNs stellen aus den oben genannten Gründen eine interessante Immunstimulanz für den klinischen Einsatz da.

- 1) Da CpG-ODNs eine natürlich bakterielle oder virale Infektion imitieren und dadurch eine Sekretion von IFN- α und IL-12 induzieren, kommt es zu einer physiologischeren Immunantwort als bei einer exogenen Gabe von rekombinanten Zytokinen, wie z.B. IFN- α .
- 2) In Studien mit Primaten konnte gezeigt werden, dass sich CpG-ODNs auch bei einer prophylaktischen oder einer therapeutischen Impfung hervorragend als Adjuvans eignen. Bereits nach einmaliger Applikation werden rascher höhere protektive Antikörpertiter erreicht [Sarris, 2005].
- 3) PDCs reagieren auf CpG-ODNs in Kombination mit CD40-Ligand mit der Bildung von IL-12. Hierdurch wird eine IL-12-abhängige TH1 Antwort induziert, die mit der Produktion von IFN- γ einhergeht. So werden Infektionen mit intrazellulären Erregern (z.B. Viren) abgewehrt, zusätzlich unterstützt sie den Körper bei der Abwehr von Tumorzellen, die viral infizierten Zellen ähneln.
- 4) Aufgrund der Fähigkeit der CpG-ODNs die Immunitätslage von einer TH2 gerichteten Antwort in Richtung einer TH1-Antwort zu verschieben, wirkt sie allergischen Reaktionen entgegen.

1.5.5 Einsatz von CpG-ODNs in der Therapie von Tumoren

Wie oben beschrieben, hatte Dr. William Coley bereits Ende des 19. Jahrhunderts die Entdeckung gemacht, dass es unter einer peri- und intratumoralen Injektion von Lysaten von Bakterien zu einem Rückgang der Tumormasse kam. Beinahe 100 Jahre später zeigte sich, dass der Einsatz von BCG eine erfolgreiche Therapiestrategie bei der Therapie des Blasenkarzinoms darstellte. All diese Beobachtungen sind deutliche Hinweise darauf, dass die Aktivierung des Immunsystems zur Bekämpfung von Pathogenen eine wichtige Rolle in der Therapie von Tumorzellen darstellt. Shankaran et al. berichtete 2001, dass insbesondere Lymphozyten und die damit verbundene Sekretion von IFN- γ das Wachstum eines Tumors verhindern können. Da CpG-ODNs genau an diesem Punkt ansetzen und über die Aktivierung von PDCs in der Lage sind Lymphozyten in Richtung einer TH1-gerichteten Immunantwort zu beeinflussen, stellen sie einen wichtigen Mechanismus zur Immunüberwachung dar. Zahlreiche Studien mit einer Monotherapie, wie auch einer Kombinationstherapie mit für Tumorzellen-spezifischen Antikörpern, bestätigten diese Hypothese sowohl im murinen, wie auch im humanen System. 1999 konnten Carpentier und

Dow zeigen, dass es unter einer Monotherapie mit CpG-ODNs bei Mäusen, unabhängig vom Tumorstadium, zu einer deutlichen Regression, wenn nicht sogar zu einer kompletten Remission kam.

2002 konnten Heckelsmiller wie auch Brunner zeigen, dass CpG-ODNs in Kombination mit unterschiedlichen Formen eines Tumor-Antigens (einzelne Peptide, Proteine oder ganze Tumorzellen) in der Lage waren, DCs so zu beeinflussen, dass diese in den sekundären lymphatischen Organen eine starke TH1-gerichtete Immunantwort auslösten, die ihrerseits eine optimale Bedingung für eine Induktion spezifischer IFN- γ -produzierender zytotoxischer T-Zellen war.

1.6. Fragestellung

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit war bekannt, dass CpG-ODNs in der Lage sind PDCs so zu aktivieren, dass diese die T-Lymphozyten in die Richtung einer TH1-gerichteten Immunantwort beeinflussen können. Über den Mechanismus, der für die Beeinflussung der T-Lymphozyten verantwortlich ist, war jedoch relativ wenig bekannt. Marschner et al. konnten in vorangegangenen Untersuchungen zeigen, dass die PDCs in der Lage sind, in NKT-Zellen eine starke IFN- γ Produktion zu induzieren [Marschner, 2005]. Weiterhin konnten sie zeigen, dass dieser Effekt nicht durch Überstände der zuvor aktivierten PDCs, also von löslichen Produkten der PDCs hervorgerufen wurde.

Da diese immunstimulatorische Aktivität der PDCs und deren Beeinflussung durch CpG-ODNs einen möglichen Ansatz als Adjuvans in einer therapeutischen Vakzine bei der Bekämpfung von Tumoren und Virusinfektionen darstellt, war es Aufgabe dieser Arbeit, die eigentliche Beeinflussung der CD8+ T-Lymphozyten durch PDCs zu untersuchen. Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass analog zu den NKT-Zellen bei CD8+ Zellen eine TH1-gerichtete Immunantwort nicht durch Überstände der aktivierten PDC zu induzieren war.

Im Einzelnen sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Gibt es analog zur NKT-Zelle eine Antigen-unabhängige Modulation der Immunantwort bei CD8+ T-Lymphozyten?
- 2) Lässt sich diese, durch PDCs induzierte Immunantwort durch CpG-ODNs beeinflussen?
- 3) Besteht ein Unterschied in der Modulation der Immunantwort bei CD8+ T-Lymphozyten, die durch PDCs oder MDCs hervorgerufen wird?
- 4) Durch welche Mechanismen wird ein möglicher immunmodulatorischer Effekt der PDC auf CD8+ T-Lymphozyten auf zellulärer Ebene vermittelt?
- 5) Gibt es funktionelle Unterschiede bezüglich der verschiedenen CpG-ODNs bei ihrer immunstimulatorischen Fähigkeit?

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien, Chemikalien und Geräte

2.1.1. Geräte

Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
FACStarplus	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Hamilton Spritze	Fa. Hamilton Co. (Reno, Nevada, USA)
Lamin Air (HB 244 8)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Mikroskop (Axiovert 25)	Fa. Zeiss (Jena, D)
MiniMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Omnifuge 2 ORS	Fa. Heraeus (Hanau, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
QuadroMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Vortex VF2	Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
VarioMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)
Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)

2.1.2. Chemikalien

Brefeldin A	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Heparin-Natrium	Fa. Ratiopharm (Ulm, D)
Ortho-mune Lyse-Reagenz	Fa. Ortho-Clinical Diagnostics (Neckarsgmünd, D)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

2.1.3. Radioaktive Chemikalien

⁵¹Chrom Fa. Amersham Biosciences (Freiburg, D)

2.1.4. Reagenziensets

Zellisolation mittels der MACS-Methode:

B Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
BDCA-1 Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
BDCA-4 Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD4+ T Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD8+ T Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD45RO MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD8 MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
IFN γ Secretion Assay	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Monocyte Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
NK Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Pan T Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA:

GranzymeB ELISA	Fa. Diaclone (Besancon codex, F)
GranzymeB ELISA Antibody pair	Fa. Hözel Diagnostika (Köln, D)
human IFN- γ ELISA	Fa. Endogen (Boston, USA)
human IFN- γ ELISA	Fa. Bender Med Systems (Wien, A)
human IFN- α ELISA	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA)
human IL-8 ELISA	Fa. Bender Med Systems (Wien, A)

2.1.6. Materialien für die Zellkultur

Biocoll Separationsmedium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Fötales Kälberserum (FCS)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)

Humanes AB-Serum	Fa. BioWhittaker (Walkersville, USA)
Humanes Serum-Albumin (HSA)	Fa. Pharmacia & Upjohn (Erlangen, D)
<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>	
(IMDM)	Fa. PAA (Linz, A)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	Fa. PAA (Linz, A)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI)</i>	
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)
Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen, D), Falcon (Heidelberg, D), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterrilin (Stone, Staffordshire, GB) und Corning (Corning, USA) bezogen.	

2.1.7. Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzien

Calcium-Ionomycin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Dynabeads CD3/CD28	Dynal Biotech (Oslo, Nor)
Dynabeads CD3	Dynal Biotech (Oslo, Nor)
<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GMCSF)</i>	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interferon- β	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA)
Interferon- α 2a	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA)
Interleukin-2	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interleukin-4	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interleukin-12	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interleukin-15	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Lipopolsaccharid (LPS) (Herkunft: <i>Salmonella typhimurium</i>)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Phytohämagglutinin (PHA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

2.1.8. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Medien und Puffer, die in dieser Arbeit verwendet wurden:

RPMI-Vollmedium 1:

100 IU/ ml Penicillin
100 µg/ ml Streptomycin
1,5 mM L-Glutamin
2 Vol % humanes A/ B-Serum
in RPMI 1640-Medium

Erythrozyten-Lysebuffer:

Ortho-mune Lysereagenz
in PBS

RPMI-Vollmedium 2:

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

Kryo-Medium:

50 Vol % IMDM-Vollmedium
40 Vol % Humanes AB-Serum

10 Vol % DMSO

MACS-Puffer:

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

2.1.9. Antikörper

Zusammenstellung der Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden:

Bezeichnung	Spezifität	Klon	Herkunft
Anti BDCA-2	BDCA-2	AC144	Miltenyi Biotec
Anti BDCA-4	BDCA-4	AD5-17F6	Miltenyi Biotec
Anti Granzyme B	Granzyme B	GB 11	BD/ Pharmingen
Anti CD3	CD3	UCHT19	BD/ Pharmingen
Anti CD4	CD4	RPA-T8	BD/ Pharmingen
Anti CD8	CD8	G42-8	BD/ Pharmingen
Anti CD11c	CD11c	B-ly6	BD/ Pharmingen
Anti CD14	CD14	3E2	BD/ Pharmingen
Anti CD19	CD19	HIB19	BD/ Pharmingen
Anti CD40	CD40	5C3	BD/ Pharmingen
Anti CD45RA	CD45RA	HI100	BD/ Pharmingen

Anti CD45RO	CD45RO	UCHL1	BD/ Pharmingen
Anti CD56	CD56	B159	BD/ Pharmingen
Anti CD69	CD69	FN50	BD/ Pharmingen
Anti CD80	CD80	L307.4	BD/ Pharmingen
Anti CD83	CD83	HB15e	BD/ Pharmingen
Anti CD86	CD86	IT2.2	BD/ Pharmingen
Anti CD 107a	CD107a	H4A3	BD/ Pharmingen
Anti CD 107b	CD107b	H4B3	BD/ Pharmingen
Anti CD123	CDw123	7G3	BD/ Pharmingen
Anti HLA-A2	HLA-A0201	Poly	P. Fisch
Anti HLA-DR	HLA-DR	L243	BD/ Pharmingen
Anti IFN- γ	IFN- γ	25723.11	BD/ Pharmingen
Anti IFN- α	IFN- α	Poly	PBL
Anti IFN- β	IFN- β	Poly	PBL
Anti IFNR	IFN-Rezeptor	Poly	PBL
Anti IL-4	IL-4	8D4-8	BD/ Pharmingen
Anti IL-12	IL-12 p40+p70	C8.6	BD/ Pharmingen
Anti IL-12	IL-12 p40-p70	AB-219-NA	R&D Systems
Anti IL-15	IL-15	247 NA	R&D Systems
Anti IL-18	IL-18	136007	R&D Systems
Anti OX40L	OX40 Ligand	159403	R&D Systems
Anti Perforin	Perforin	δ G9	BD/ Pharmingen
Anti SLAM	SLAM	A12	L. Lanier
Anti TNF- α	TNF- α	mAb11	Endogen
Anti V γ 9	V γ 9	Immuno360	Immunotech

2.1.10. Oligodesoxynukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten komplett oder teilweise Phosphorothioat-modifizierten ODNs wurden freundlicherweise von Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, USA) zur Verfügung gestellt. Bei den fett gedruckten Strukturen handelt es sich um die jeweiligen CpG Dinukleotide, wobei kleine Buchstaben für Verknüpfungen durch Phosphorothioate und große Buchstaben für Verknüpfungen durch Phosphodiester am 3'-Ende der Base stehen:

Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz (5' → 3')	Referenz
ODN 2006	Tcgtcgtttgtcggttgcgtt	[Hartmann, 2000a]
ODN 2216	GgGGGACGAT CGTCggggG	[Krug, 2001a]

2.1.11. Zelllinien

Die aufgelisteten Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

Zelllinie	Zellart	Herkunft	Referenz
K562	Humane Erythroblasten-Leukämie-Zelllinie, negativ für MHC-I	ATCC	[Lozzio, 1975]
Daudi	Humane Burkitt-Lymphom- Zelllinie, negativ für MHC-I	Fisch, P (Freiburg, D)	[Ohsugi, 1980]

2.2. Zellulär-immunologische Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Allgemeine Kulturbedingungen

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

2.2.1.2. Kultivierung der Tumorzelllinien

Die Tumorzelllinien wurden in 75 ml Kulturflaschen in RPMI Medium mit FCS kultiviert. Hierbei wurde regelmäßig die Kultur unter dem Lichtmikroskop auf Anzahl der lebenden Zellen, wie auch auf mikrobielle Verunreinigung kontrolliert. Das Medium wurde dem Wachstum der Zellen entsprechend alle zwei bis drei Tage dekantiert und durch frisches RPMI Medium mit FCS ersetzt. In sämtlichen Zelllinien wurde eine Kontamination mit Mykoplasmen ausgeschlossen.

2.2.1.3. Bestrahlung der Tumorzelllinien

Um eine Zellproliferation in Stimulationspopulationen zu verhindern, wurden die Tumorzellen alternativ durch Röntgen- oder UV-Strahlung deaktiviert. Für die Röntgenbestrahlung wurden die jeweiligen Zellen in 2 – 3 ml Medium suspendiert und mit 30 Gray in einer Röntgenbestrahlungsanlage (Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München) bestrahlt. Alternativ wurden für die UV-Bestrahlung die jeweiligen Zellen in einer Konzentration von 5–10 Mio./ml in Medium aufgenommen und mit UV-Licht einer Energie von 0,25 J/cm² bestrahlt.

2.2.1.4. Kultivierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die aufgereinigten Zellpopulationen wurden in 96-Well Rundbodenplatten in RPMI mit 2 Vol % A/B-Serum kultiviert. Für einige Versuche wurden die Zellpopulationen so kultiviert, dass ein Zell-Zellkontakt ausgeschlossen werden konnte. Hierfür wurden die Zellpopulationen durch Transwell-Membranen, die aufgrund ihrer Porengröße ausschließlich den Austausch von löslichen Faktoren zulassen, getrennt in 96-Well Rundbodenplatten oder 24-Well Flachboden-Platten kultiviert.

2.2.1.5. Bestrahlung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Um Zellinteraktionen untersuchen zu können, wurden in einigen Versuchen für die Zellkultur aufgereinigte Zellpopulationen in einer Konzentration von 1–5 Mio./ml in Medium aufgenommen und mit einer Energie von 0,75 J/cm² bestrahlt.

2.2.1.6. Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl

Zur Feststellung der Vitalität, wie auch der Zellzahl, wurde der Trypanblau-Ausschlusstest angewendet. Während lebende Zellen den Farbstoff ausschließen, reichern tote Zellen diesen an. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Anzahl in einer geeigneten Verdünnung in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.2.2. Durchflusszytometrie

2.2.2.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Das eigentliche Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie mittels eines *Fluorescence-activated cell sorters* (FACS) beruht darauf, dass verschiedene mikroskopisch kleine Partikel anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächenstrukturen und ihrer intrazellulären Zusammensetzung charakterisiert werden können. Hierbei werden Streulicht und Fluoreszenz-Signale einzelner Zellen analysiert, während diese in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln durch das Licht eines Laserstahls geführt werden. Durch die in diesem Flüssigkeitsstrom enthaltenen Zellen wird das Laserlicht gestreut, so dass es von zwei im 90° Winkel zueinander angeordneten Photozellen detektiert werden kann. Das in Laserstrahlrichtung eingefangene Licht, man spricht auch von Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter (FSC), ist hierbei ein Maß für die Größe der gemessenen Zellen, während das in einem 90° Winkel abgestrahlte und dort eingefangene Licht, also Seitwärtsstreulicht oder Sidescatter (SSC), als ein Maß für die Zellgranularität dient. Sind die Zellen, oder besser ihre Oberflächenproteine, mit spezifischen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert, lassen sich auch über den Phänotypen der zu untersuchenden Zelle Aussagen machen. Hierbei wird ein Teil der Lichtenergie durch das Fluorochrom absorbiert und durch ein für den Farbstoff spezifisches Fluoreszenzlicht wieder abgegeben. Das so abgestrahlte Licht wird dann von einer Linse gebündelt und mittels diverser Spiegel und Filter in die einzelnen Wellenlängen aufgespaltet, so dass das Licht eines bestimmten Fluorochroms weitergeleitet wird, während das Fluoreszenzlicht der anderen Fluorochrome weitestgehend herausgefiltert werden kann. Das so entsprechend seiner Wellenlänge aufgeteilte Licht kann dann von Detektoren erfasst werden. Da sich jedoch das Spektrum an ausgesendeten Wellenlängen der Fluorochrome überlappt und die Bandpassfilter des FACS nur in der Lage sind einen bestimmten Wellenlängenbereich, nicht jedoch eine spezifische Wellenlänge heraus zu filtern (ein Bandpassfilter 530/30 lässt z.B. Licht mit einem Mittelwert von 530nm in einem Bereich von 515nm bis 545nm passieren) muss vor Beginn einer Messung eine Kompensation durchgeführt werden. Hierfür wird je Fluorochrom eine Kontrollprobe aufgenommen, die es ermöglicht den überlappenden Anteil von dem eigentlichen zu detektierenden Fluoreszenzsignal abzuziehen.

Für die eigentliche Färbung der Oberflächenmoleküle stehen zwei verschiedene Methoden zur Auswahl. Bei der ersten, der direkten Fluoreszenz wird das zu untersuchende Oberflächenmolekül direkt mit einem an das Fluorochrom gekoppelten Antikörper markiert. Bei der anderen, der indirekten Fluoreszenz erfolgt diese Färbung in zwei Schritten. Im

ersten wird das Oberflächenmolekül, das von Interesse ist, durch einen nicht an ein Fluorochrom gekoppelten Antikörper gebunden. Dieser wird dann später in einem zweiten Schritt durch einen an ein Fluorochrom gebundenen Antikörper, der gegen den FC-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist, „eingefärbt“.

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

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

2.2.2.2. Bestimmung der Oberflächeneigenschaften einer Zelle

Für die Analyse von Oberflächenmolekülen wurden je nach Anzahl der zur Verfügung stehenden Zellen (5×10^5 - 3×10^6 Zellen) in einem FACS Probe Röhrchen bei 400g für 7 Minuten und bei 4° C abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, und in der verbliebenen Flüssigkeit die Zellen resuspendiert. In Dunkelheit erfolgte dann für 15 Minuten bei 4° C die Färbung der Oberflächenmoleküle der Zelle durch mit APC-, FITC-, PE-, PerCP-gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) oder mit einem ungekoppelten Antikörper (indirekte Fluoreszenz). Anschließend wurde die Zell-Antiköpersuspension mit PBS einmal gewaschen. Bei der indirekten Fluoreszenz wurde dann der Inkubationsschritt wiederholt, gemäß obiger Beschreibung dieses Mal jedoch mit einem gegen den FC-Teil des ersten Antikörpers gerichteten an APC, FITC, PE oder PerCP gekoppelten Antikörper. Je nach der Überlebensrate der zu messenden Zellen wurde dann zur Anfärbung etwaiger toter Zellen PI oder TOPRO-3 kurz vor der eigentlichen FACS-Analyse hinzugegeben. Die Strahlungsintensität wurde dann mit Hilfe eines FACSCalibur gemessen und anschließend mit Cell Quest Software analysiert und ausgewertet.

2.2.2.3. Bestimmung von intrazellulären Molekülen mittels FACS Technologie

Nach der Färbung der Zellen gemäß Punkt. 2.2.2.2. wurden die Zellen mit 100 μ l Paraformaldehyd (Lösung A, *Fix & Perm-Reagenz*) für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit fixiert, um ein Ausbleichen der bereits markierten Oberflächenmoleküle zu verhindern, und danach mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die so fixierten und gereinigten Zellen mit 100 μ l saponinhaltiger Lösung (Lösung B, *Fix & Perm-Reagenz*) für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit permeabilisiert, und der für die Untersuchung benötigte Fluoreszenz-Antikörper z.B. GranzymeB (2 μ g/ml) hinzu gegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 15 Minuten in Dunkelheit wurden die Zellen dann einmal mit PBS gewaschen, um anschließend entsprechend dem oben beschriebenen Procedere die Messung und Analyse durchzuführen.

2.2.2.4. Messung der Zytotoxizität mittels Durchflusszytometrie

Zur Messung der Zytotoxizität wurden die frisch isolierten Zellsorten miteinander für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss daran wurde zu der Zellkultur ein gegen CD107a (LAMP1) gerichteter Antikörper gegeben (4 μ g/ml) und für eine weitere Stunde in Anwesenheit dieses Antikörpers inkubiert. CD107a ist ein Marker für die Zytotoxizität einer Zelle. Normal befindet sich CD107a im Lysosom zytotoxischer T- und NK-Zellen, jedoch kommt es nach Aktivierung und der damit verbundenen Freisetzung lysosomaler Granula zur Expression von CD107a an der Zelloberfläche. Um eine stärkere Anreicherung des Antikörpers zu erreichen, wurde nach dieser Stunde für weitere 5 Stunden der Sekretionshemmer Brefeldin A hinzu gegeben. Direkt danach wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und die Oberflächenmoleküle entsprechend Punkt 2.2.2.2. gefärbt. Im Anschluss wurde dann die Messung mit einem FACSCalibur durchgeführt.

2.2.2.5. Messung der Zellproliferation mittels FACS Technologie

Die Analyse einer Proliferation mittels Durchflusszytometrie ist aufgrund der prozentualen Angabe einer Zellpopulation bei der Auswertung relativ schwierig, da ein relativ vermehrter Anteil einer Zellpopulation auf der einen Seite durch Proliferation, auf der anderen Seite jedoch durch einen erhöhten Verlust der anderen Zellpopulationen auftreten kann. Im zweiten Fall käme es hierdurch zu einer vorgetäuschten Vermehrung dieser Zellpopulation. Um dennoch eine Proliferationsmessung mittels Durchflusszytometrie bewerkstelligen zu können, bedient man sich des Farbstoffes 5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-

Ester (CFSE). CFSE besitzt die besondere Eigenschaft irreversibel an zellulären Proteinen zu binden. Bei der Zellteilung wird nun der gebundene Farbstoff jeweils zur Hälfte an die beiden Tochterzellen weiter gegeben. Da die Intensität der ausgesendeten Strahlung mit der Menge, des an ihr gebundenen bzw. in ihr enthaltenem Farbstoffes korreliert, strahlt somit eine Tochterzelle nur halb so stark wie ihre Mutterzelle.

Um eine homogene Zellfärbung zu erreichen, wurden deshalb 10 Mio. Zellen in 400 μ l PBS aufgenommen und mit 1 μ M CFSE Konzentrat zusammen gegeben. Anschließend wurde die Suspension durchmischt, in ein neues Gefäß überführt, um auszuschließen, dass ungefärbte Zellen, die während des Färbeprozesses an der Wand hafteten, mit in die Kultur gelangen. Es folgte eine weitere Inkubation für 10 Minuten auf Eis. Zur Beendigung der Färbereaktion und zu einer Blockierung des extrazellulären CFSE wurde dann zu der Suspension 2 ml RPMI-Vollmedium gegeben und anschließend zweimal mit 130 mM NaCl (physiologische Kochsalzlösung) gewaschen.

2.2.3. Aufreinigung der einzelnen Zellpopulationen und Kultur der Zellpopulationen

2.2.3.1. Aufreinigung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Gesunden Spendern wurde, sofern nicht anders angegeben, 200 ml Blut abgenommen, das pro 10 ml Blut mit 100 μ l Heparin versetzt wurde. Im Anschluss wurde mit einer maximalen Verzögerung von 60 Minuten aus diesem Blut die peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) isoliert.

Hierfür wurden jeweils 50 ml Blut auf 2 Röhrchen à 50 ml verteilt, die zuvor mit jeweils 15 ml Ficoll-Hypaque Lösung gefüllt worden waren, und anschließend mit steriles NaCl (s.o.) auf 50 ml Gesamtvolume aufgefüllt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die verschiedenen Phasen nicht vermischten. Durch den, durch die Ficoll-Hypaque Lösung aufgebauten, Dichtegradienten zeigte sich nach einer Zentrifugation (1000 g, 20 °C, 20 min, Beschleunigung 1, Bremsung 1) folgende Schichtung im 50 ml-Röhrchen: Öffnungsnah Plasma, dann eine Schicht aus mononukleären Zellen, mittig das Ficoll-Hypaque und an dem Spitzen Ende des Röhrchens eine Schicht aus Erythrozyten. Nachdem zunächst das Plasma abpipetiert wurde, wurde dann die Schicht der mononukleären Zellen vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Dieses wurde ein weiteres Mal mit steriles NaCl (s.o.) auf ein Gesamtvolume von 50 ml aufgefüllt und anschließend erneut zentrifugiert (520 g, 20 °C, 15 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Direkt danach wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 ml NaCl resuspendiert, jeweils zwei 50 ml-Röhrchen in eines zusammengeführt und erneut mit steriles NaCl auf ein Gesamtvolume

von 50 ml aufgefüllt. Am Anschluss an die Zentrifugation (400 g, 4 °C, 10 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4) wurde nach dem Dekantieren des Überstandes das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um etwaige, verbliebene Erythrozyten aus der Suspension zu entfernen. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die mononukleären Zellen dann in das jeweils gewünschte Nährmedium aufgenommen und in einer Neubauer-Kammer unter Zugabe von Trypanblaufärbung gezählt. Anschließend wurden die Zellen auf die gewünschte Konzentration eingestellt, wobei darauf geachtet wurde, dass nur mononukleäre Zellfraktionen weiterverwendet wurden, bei denen weniger als 5% der Gesamtzellzahl den Farbstoff Trypanblau aufnahmen.

2.2.3.2. Aufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung

Das allgemeine Funktionsprinzip der *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)-Isolationstechnik beruht darauf, dass an bestimmte Oberflächenproteine der gesuchten Zellen, mit paramagnetischen Mikropartikeln (sogenannten Microbeads) von einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelte, Antikörper gebunden werden, die dann in einem späteren Schritt mittels eines Magneten aussortiert werden können. Hierfür wurden die Zellen zuerst für 15 Minuten in einem speziellen MACS Puffer bei 4°C mit den Microbeads inkubiert, so dass diese an die Oberflächenmoleküle binden konnten. Anschließend erfolgte ein Waschschritt, um nicht gebundene Microbeads wieder entfernen zu können. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen wieder in MACS Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die so gewonnene Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält. Im Einflussfeld eines starken Permanentmagneten werden somit die mit den Microbeads beladenen Zellen zurückgehalten. Um zufällig in der Matrix verbliebene, nicht markierte Zellen aus dieser zu entfernen, wurde die Trennsäule drei Mal mit 3 ml MACS Puffer nachgespült. Danach wurden die in der Säule verbliebenen, mit Microbeads gebundenen Zellen mittels 3 ml MACS Puffer, sowie einem Stempel (zur Erhöhung des Durchflussdrucks) außerhalb des Magnetfeldes aus der Trennsäule eluiert (z.B. CD8+ T-Lymphozyte), wobei eine Reinheit zwischen 80-97% erreicht werden konnte (CD8 T-Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec). Um die Reinheit bestimmter Zellpopulationen zu erhöhen, wurde der Trennsäulenschritt mit einer kleineren Säule und 0,5 ml MACS Puffer für die Spülsschritte wiederholt. Bei dieser Art der Aufreinigung handelt es sich um eine positive Selektion.

Alternativ zu oben beschriebener Methode wurden aus PBMCs (Zellen des peripheren Bluts), die von dem selben Spender 48h zuvor gewonnen wurden, durch Makierung der Non-

PDCs und Non-MDCs in mehreren Schritten PDCs (BDCA-4 Isolation Kit, Miltonyi Biotec) und MDCs (BDCA-1 DC Isolation Kit, Miltonyi Biotec) isoliert, so dass im Überstand nach Durchfluss mehrerer Separationssäulen im Überstand die gewünschten Zellpopulationen übrig blieben. Hierbei konnte eine Reinheit zwischen 70-95% bei den PDCs und eine etwas höhere Reinheit von circa 95% bei den MDCs erreicht werden.

2.2.3.3 Kultivierung der Zellpopulationen

Die frisch isolierten PDCs (100.000 Zellen pro ml) wurden nach Zugabe von IL-3 (10 ng/ml) und in den Bedingungen in denen diese benötigt wurde mit CpG-ODN 2006 (3 μ g/ml) für 48h im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit bei einem Anteil von 5% CO₂ inkubiert. Analog zu den PDCs wurden die frisch gewonnenen MDCs mit IL-4 (10 ng/ml), GM-CSF (30 ng/ml) und in den Bedingungen, in denen dies erforderlich war mit LPS (100 ng/ml) inkubiert. Nach 48h wurde sowohl bei den PDCs wie auch bei den MDC der Überstand abgenommen, die Zellpopulationen zweimal geschwaschen und in neues Medium überführt und gezählt.

Im Anschluss wurden die, wie oben beschrieben, vorinkubierten PDCs und MDCs mit frisch isolierten CD8+ T-Lymphozyten im Verhältnis 1:20 (5.000 PDCs/MDCs und 100.000 CD8+ T-Lymphozyten) in round-bottom 96-Well-Mikrotiterplatten für 48h im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit bei einem Anteil von 5% CO₂ inkubiert. Die Stimulation in den Ansätzen in denen die CD8+ T-Lymphozyten mittel CD3-Beads aktiviert werden sollten, erfolgte durch Zugabe von 200 μ l/100 Mio. Zellen Dynabeads CD3

In den Ansätzen in denen eine Blockierung löslicher Faktoren oder spezieller Oberflächenproteinen durchgeführt wurde, erfolgte zusätzlich die Zugabe von blockierenden Antikörpern (Anti-IL-12 2 μ g/ml, Anti-IL-15 2 μ g/ml, Anti-IL-18 2 μ g/ml, Anti-OX40L 1 μ g/ml, Anti-IFN- α 0,1 μ g und 1 μ g/ml, Anti-CD28 2 μ g/ml) sowie eines nicht blockierenden Kontroll-Antikörpers (IgG1, Sigma) in der selben Konzentration 30 Minuten vor Zugabe der T-Lymphozyten.

Im Anschluss wurden die Überstände der einzelnen Bedingungen abgenommen und bei -20 Grad Celsius bis zur Analyse aufbewahrt.

2.2.4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.2.4.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Die Anfänge des ELISAs reichen in das Jahr 1971 zurück, als zwei Arbeitsgruppen [Avrameas, Guilbert, 1971 und Engvall, Perlman, 1971] zeitgleich diese Methode beschrieben. Hierbei wird die Menge eines zu bestimmenden Proteins mittels des Substratumsatzes durch ein Enzym, das als Marker verwendet wird, bestimmt. Je nach verwendeter Methode ist dabei entweder das Antigen oder aber der Antikörper an eine feste Phase adsorbiert. In dieser Arbeit wurde das sogenannte Sandwich-Verfahren verwendet. Hierfür wird in einem ersten Schritt ein Antikörper an die feste Phase gebunden. Nach mehreren Block- und Waschschritten werden dann die Proben aufgetragen, die an die für sie spezifischen Antikörper, die an der festen Phase gekoppelt sind, binden können. Um das nicht gebundene Antigen zu entfernen, wird danach die Platte mehrfach mit Waschpuffer gereinigt und dann mit einem spezifischen, gegen das Antigen gerichteten Detektionsantikörper inkubiert, der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Für die eigentliche Auswertung wird nach mehreren Waschschritten, die den nicht gebundenen Detektionsantikörper entfernen sollen, das Substrat 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) auf die so vorbereitete Platte aufgetragen. Durch die Einwirkung des Enzyms kommt es bei dem Substrat zu einem Farbumschlag, der umso stärker ist, je mehr Detektionsantikörper und somit Enzym an das Antigen gebunden ist. Der Farbumschlag korreliert somit also direkt mit der Menge des gebundenen und somit in der Probe vorhandenen Antigens. Um eine spätere Auswertung des Tests am Computer zu ermöglichen, wird zeitgleich neben den eigentlichen Proben eine Standardreihe mit bekannter Proteinmenge auf die Platte pipettiert, die eine genaue Berechnung der in den Proben enthaltenen Menge eines Proteins zulässt.

2.2.4.2. Bestimmung der Proteinmenge mittels eines ELISAs

Zur Vorbereitung der Platte für den ELISA wurde in jedes Well der 96-Well-Mikrotiterplatte jeweils 100 μ l Coating Buffer mit einem für das Protein spezifischen Antikörper pipettiert und für ca. 12 Stunden bei 4°C inkubiert, so dass dieser an das Polystyrol binden konnte. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blocken, wurde anschließend, nach dreimaligem Waschen, jedes Well mit 200 μ l proteinhaltiger Verdünnungslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur befüllt. Nach drei-maligem Waschen wurden dann die eigentlichen Proben auf die so vorbereitete Platte gegeben. Um den maximalen Messwert des Systems, der durch den höchsten Proteinwert in den Standardreihen vorgegeben wurde, nicht zu

überschreiten, wurden die Überstände der verschiedenen Versuchsansätze, in denen besonders hohe Werte des zu bestimmenden Proteins erwartet wurden, mit Verdünnungslösung verdünnt. Die so gefüllte Platte wurde dann für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, so dass die zu bestimmenden Proteine an den auf der Well-Oberfläche befindlichen Antikörper binden konnten. Im Anschluss wurde der Überstand mit den nicht gebundenen Proteinen entfernt und durch fünfmaliges Waschen sichergestellt, dass sich keine nicht-gebundenen Proteine mehr auf der Platte befanden. Danach wurde in jedes Well $100 \mu\text{l}$ eines Gemisches aus einem Protein-spezifischem und biotinyliertem Antikörper und einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat gegeben. Über die Ausbildung von mehreren Biotin-Streptavidin-Brücken pro Antikörper kommt es dabei zu einer weiteren Signalverstärkung. Im Anschluss an die einstündige Inkubation wurde dann nach erneutem siebenmaligem Waschen jeweils $100 \mu\text{l}$ des eigentlichen Substrats auf die Platte gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Um den chemischen Prozess und damit den Farbumschlag, durch eine Deaktivierung des Enzyms zu stoppen, wurden jeweils $50 \mu\text{l}$ einer 1 molaren Schwefelsäure (H_2SO_4) in die Wells pipettiert. Die photometrische Auswertung erfolgte dann in einem ELISA Reader.

2.3. Statistische Analyse

Bei mehreren Versuchen, die nach demselben Protokoll durchgeführt wurden und dieselben Sachverhalte untersuchen sollte, ist das arithmetische Mittel angegeben, wobei die Abweichung der Messwerte von dem ermittelten Mittelwert als Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of mean*, SEM) angegeben ist. Für eine Berechnung der Signifikanz der Unterschiede zweier Ergebnisse wurde der zweiseitige Student-t-Test für paarige Stichproben parametrischer Verteilungen angewendet. Eine statistische Signifikanz wurde bei p-Werten $< 0,05$ b.z.w. $p < 0,01$ angenommen und ist in den Graphen und Grafiken durch * bzw. ** angegeben. Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm StatView D-4.5 (Abacus Concepts, CA, USA) herangezogen. Die rechnerische Auswertung, sowie die graphische Darstellung erfolgte mit den Microsoft Programmen Excel X und PowerPoint X für Mac (Microsoft Cooperation, CA, USA).

3. Ergebnisse

3.1. Die plasmazytoide dendritische Zelle induziert eine Antigen-unabhängige IFN-Induktion in (anti-CD3-stimulierten) CD8⁺ T – Lymphozyten

Im Jahr 2005 konnten Marschner et al. zeigen, dass die plasmazytoide dendritische Zelle über die Synthese von IFN- α hinaus auch über direkten Zellkontakt die Effektorfunktion von natürlichen Killer T (NKT) – Zellen steuern kann. Es konnte weiterhin am Beispiel der NKT Zelle gezeigt werden, dass ein direkter Zellkontakt mit aktivierten plasmazytoiden dendritischen Zellen zu einer Amplifikation der IFN- γ Produktion der NKT Zelle führt. Eine Beteiligung des NKG2D Rezeptors wurde postuliert. Die Aktivierung erfolgte durch CpG-Oligonukleotide, die zu einer ähnlichen Stimulation der plasmazytoiden dendritischen Zelle führen wie bei einer Virusinfektion. Da plasmazytoide dendritische Zellen im Gegensatz zu den myeloiden dendritischen Zellen nicht die Fähigkeit zur Phagozytose besitzen und auch kein CD1d exprimieren, konnte gezeigt werden, dass die plasmazytoide dendritische Zelle nicht in der Lage ist, das NKT-Zell-spezifische Antigen (α GalCer) zu präsentieren (Kadowaki et al. 2001). Somit konnten Marschner et al. zeigen, dass ist in diesem Fall die Regulation der Effektorfunktion unabhängig von der eigentlichen Antigenpräsentation ist. Um eine ähnliche Konstellation mit der plasmazytoiden dendritischen Zelle und der CD8+ T-Zelle nachzustellen und die von Lorza et al. 2002 beschriebene große Ähnlichkeit der Differenzierungsstadien der NKT-Zelle und der CD8+ T-Zellen auch hinsichtlich dieses Verhaltens zu überprüfen, wurden aus PBMCs desselben Spenders sowohl die plasmazytoiden dendritischen Zellen als auch die CD8+ T-Zellen mittels MACS Technologie isoliert. Diese Zellpopulationen wurden dann für 48 Stunden miteinander inkubiert. An Stelle des für die NKT-Zellen spezifischen Antigens (α GalCer) wurde ein, für den CD3 T-Zell Rezeptor, spezifisches Antigen (anti-CD3 Beads) gewählt (siehe Abb. 2).

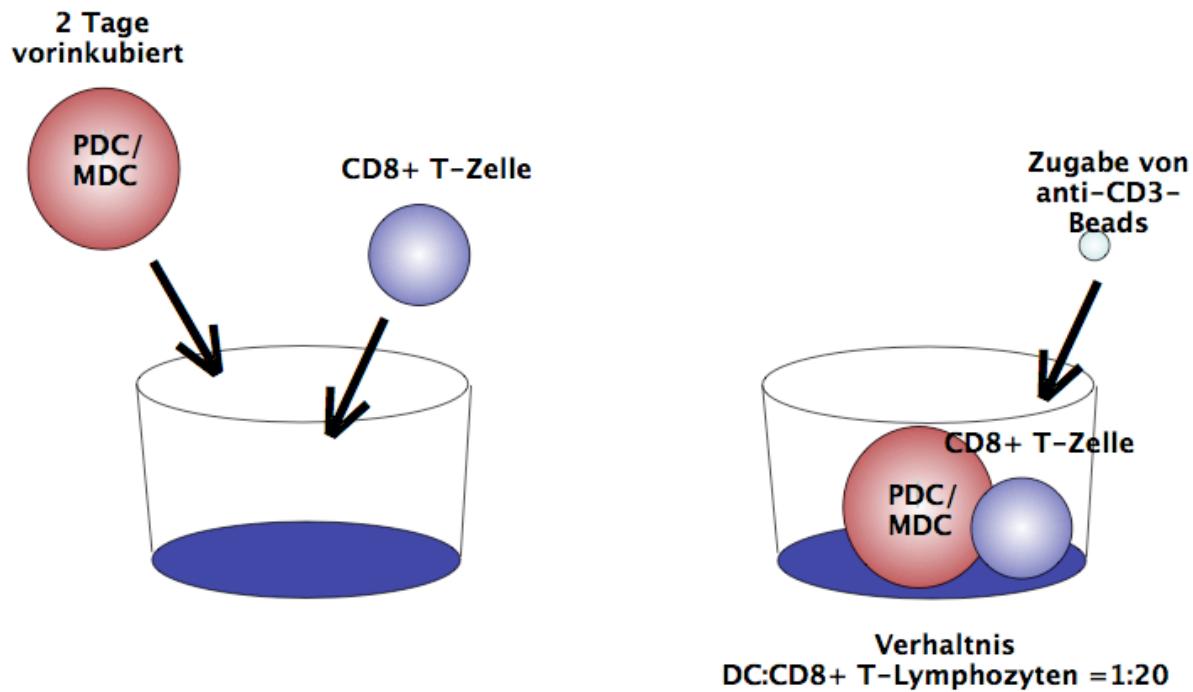


Abb. 2: Schema-Zeichnung des Grundversuch-Aufbaus.
PDCs/MDCs werden nach einer 48-stündigen Vorinkubation mit frisch gewonnenen T-Lymphozyten des selben Spenders in Kultur gegeben und für 48h Begasungsbrutschrank bei 37°C inkubiert.

3.1.2. Die (CpG-) TLR9-vermittelte Aktivierung von PDCs führt zu einer deutlichen Steigerung der Antigen-unabhängigen Kostimulation von CD8+ T-Zellen

In einem ersten Versuch sollte der optimale Zeitpunkt für die Stimulation der PDCs mit dem CpG-Oligonukleotid, sowie der optimale Zeitpunkt für die Inkubation mit der CD8+ T-Zelle gefunden werden. Hierfür wurde von Spendern im Abstand von 48 Stunden zweimal Blut entnommen. Am ersten Tag wurden ausschließlich plasmazytoide dendritische Zellen, und nach weiteren 48 Stunden aus frischen Blut desselben Spenders sowohl plasmazytoide dendritische Zellen wie auch CD8+ T-Zellen isoliert. Die bereits seit 48 Stunden mit IL-3 und CpG Oligonukleotiden vorinkubierten plasmazytoiden dendritischen Zellen wurden dann nach mehrfacher Waschung mit den frisch gewonnenen plasmazytoiden dendritischen Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Induktion einer IFN- γ Produktion in CD8+ T-Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden verglichen. Hierbei zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der bereits seit 48 Stunden mit IL-3 und CpG Oligonukleotid vorinkubierten plasmazytoiden dendritischen Zellen gegenüber den frisch isolierten PDCs (siehe Abb. 3), $n=8$, $p<0.001$.

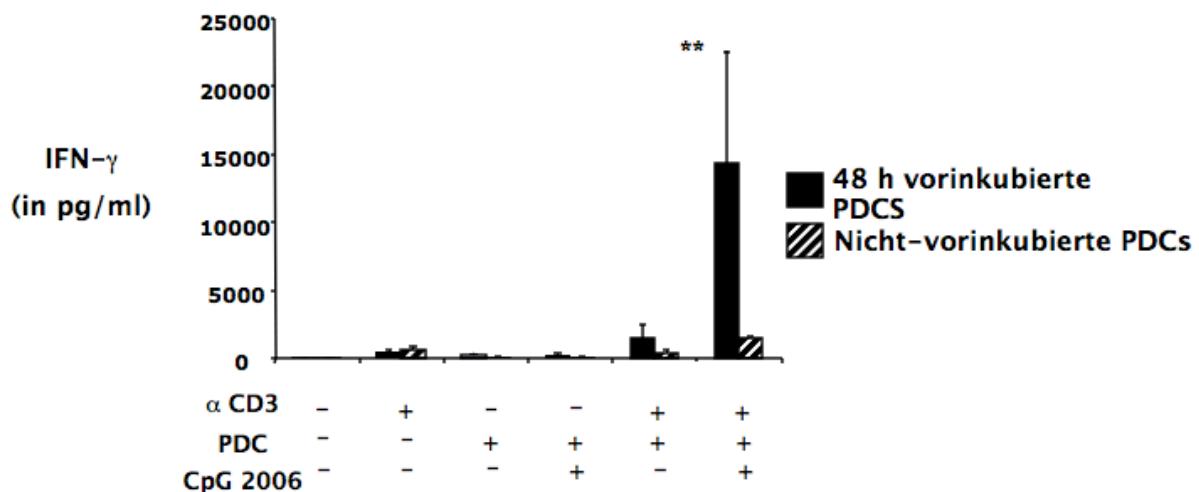


Abb. 3: 48-stündige Vorinkubation der PDC mit CpG 2006.
Eine 48-stündige Vorinkubation der PDC mit CpG 2006 (3 μ g/ml) in Kombination mit einem anschließenden Mediumwechsel zeigt einen signifikanten Anstieg der IFN- γ Konzentrationen im ELISA (n=8), $p<0.001$.

In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass bereits die Anwesenheit einer nicht mit CpG-Oligonukleotid 2006 vorinkubierten plasmazytoiden dendritischen Zelle zu einem leichten Anstieg der INF- γ Sekretion durch die CD8+ T-Zelle führte, sobald diese einen Stimulus, in diesem Fall das für den T-Zell Rezeptor spezifische Antigen (anti-CD3 bead) erhält (siehe Abb. 4), n=21. Eine Signifikanz konnte für diesen Effekt jedoch nicht nachgewiesen werden.

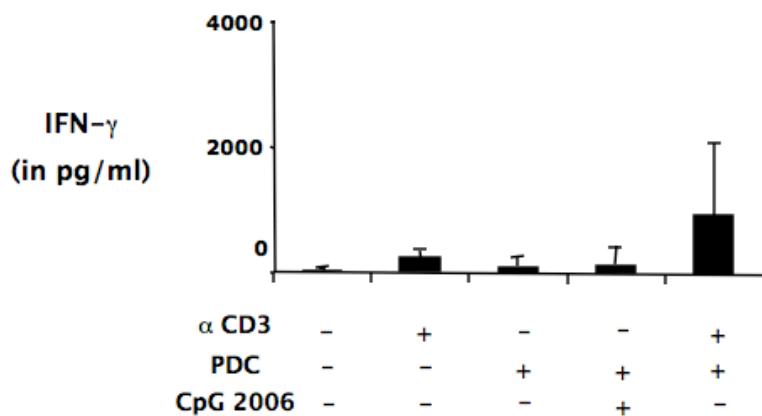


Abb. 4: IFN- γ Produktion CD8-positiver T-Lymphozyten in Abhängigkeit der Stimulation des TZR.

In den Kontrollbedingungen CD8-positiver T-Lymphozyt alleine, in Kombination mit Stimulation des TZRs und in Kokultur mit aktivierten PDCs ohne Stimulation des TZR zeigt sich nur eine geringe IFN- γ Produktion. Die Kokultur von mittels CD3-Beads (200 μ l/100 Mio. Zellen) aktivierten T-Lymphozyten mit nicht aktivierten PDCs zeigt bereits einen, jedoch nicht signifikanten, Anstieg der IFN- γ Produktion (n=21)

Wie bereits die Ergebnisse von Marschner et al. vermuten ließen, ist dieser Effekt jedoch um ein Vielfaches steigerbar, sobald die plasmazytoide dendritische Zelle zusätzlich durch das für sie spezifische Antigen (CpG-Oligonukleotid) über ihren TLR9 Rezeptor aktiviert wird. Sowohl dieser, wie auch der letzte Befund zeigen, dass die Anwesenheit eines für den CD3 T-Zell Rezeptor spezifischen Stimulus, wie auch eine Aktivierung des TLR9 Rezeptors auf der plasmazytoiden dendritischen Zelle, gemeinsam Voraussetzungen für die Steigerung der IFN- γ Produktion in CD8+ T-Zellen sind. In den Kontrollbedingungen, in denen nur einer der Stimuli, sei es nun das CD3 spezifische Antigen, oder aber auch das CpG-Oligonukleotid alleine auf den T-Lymphozyten einwirkt, lassen sich keine signifikant erhöhten IFN- γ Spiegel in den Überständen nachweisen (siehe Abb. 5), n=21, p<0.05.

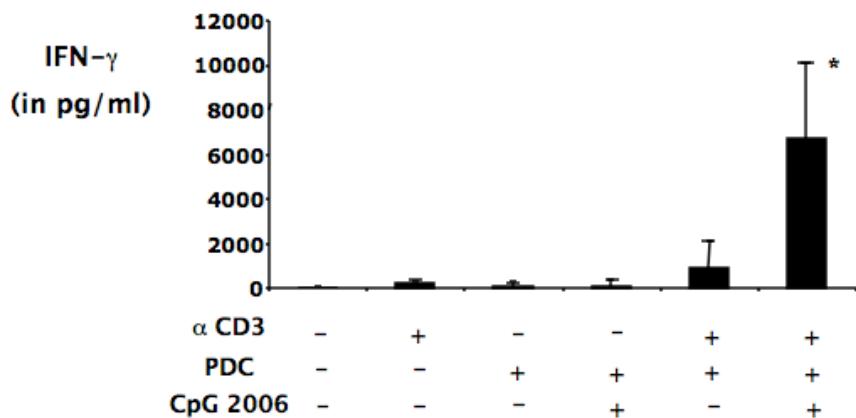


Abb. 5: IFN- γ Produktion CD8-positiver T-Lymphozyten in Abhängigkeit der auf sie einwirkenden Stimuli.

In den Kontrollbedingungen CD8-positiver T-Lymphozyt alleine, in Kombination mit Stimulation des TZRs und in Ko-Kultur mit aktivierten PDCs ohne Stimulation des TZR zeigt sich fast keine IFN- γ Produktion. Die Stimulation eines über den TZR voraktivierten T-Lymphozyten mit zuvor durch CpG-ODN 2006 (3 μ g/ml) aktivierten PDCs zeigt einen signifikanten Anstieg der IFN- γ -Produktion (n=21), $p<0.05$.

3.1.3. Der Vergleich von MDCs und PDCs zeigt eine deutliche Überlegenheit von PDCs in der Antigen-unabhängigen Kostimulation von CD8+ T-Zellen

Von zahlreichen Arbeitsgruppen wurde in der Vergangenheit die plasmazytoide dendritische Zelle bezüglich ihrer Rolle im Immunsystem mit der Rolle der myeloiden dendritischen Zelle verglichen. Hierbei wurde stets diskutiert, dass PDCs eine wesentlich schwächere bzw. keine TH1-gerichtete Immunantwort induzieren können als MDCs. Insofern sollte in folgenden Versuchen Unterschiede hinsichtlich der Potenz einer möglichen Kostimulation von CD8+ T-Zellen im Vergleich zu myeloiden dendritischen Zellen gesucht werden. Hierfür wurden aus den PBMCs sowohl PDCs als auch MDCs desselben Spenders isoliert, und diese jeweils naiv oder für 48 Stunden mit den für sie spezifischen Antigenen (für die PDC der TLR9-Stimulus CpG-Oligonukleotid 2006, bei MDCs der TLR4-Rezeptor Stimulus Lipopolysaccharid) vorinkubiert, danach gewaschen und mit, von demselben Spender, frisch isolierten CD8+ T-Zellen inkubiert. Nach 48 Stunden wurde dann die Aktivierung der CD8+ T-Zellen anhand ihrer Zytokinsekretion mittels ELISA gemessen.

Vergleich PDC vs. MDC bei INF- γ Induktion

Es zeigte sich, dass nach einer 48-stündigen Vorinkubation der dendritischen Zellen die PDCs im Vergleich mit den MDCs in der Lage waren, in den CD8+ T-Zellen bei gleichen Bedingungen ein Vielfaches der INF- γ Produktion zu induzieren (siehe Abb. 6), n=15, p<0.001.

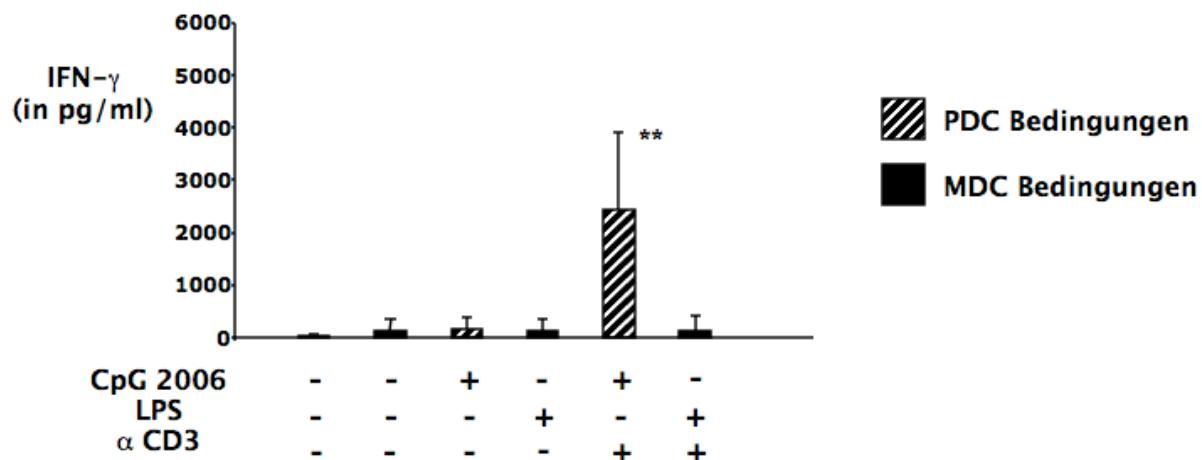


Abb. 6: Vergleich der IFN- γ Sekretion von CD8-positiven T-Lymphozyten in einer Ko-Kultur mit mittels CpG-ODN 2006 (3 μ g/ml) stimulierten PDCs und mittels LPS (100 ng/ml) stimulierten MDCs.
Die mit aktivierten PDCs koinkubierten, mittels CD3 Beads (200 μ l/100 Mio. Zellen) über ihren TZR aktivierte, T-Lymphozyten zeigen eine signifikant höhere IFN- γ Sekretion als die mit aktivierten MDCs koinkubierten T-Lymphozyten (n=15), p<0,001.

3.2. PDCs steigern die Zytotoxizität von aktivierte CD8+ T-Zellen

Da IFN- γ selbst keine zytotoxische Wirkung aufweist, sollte in weiteren Versuchen eine mögliche Auswirkung der Anwesenheit von PDCs oder MDCs in Abhängigkeit ihres Aktivierungszustandes auf die Zytotoxizität CD8+ T-Zellen untersucht werden. CD8+ T-Zellen haben die Möglichkeit, die zelluläre Immunabwehr auf der einen Seite über die Sekretion von Perforinen und Granzymen und auf der anderen Seite über direkten Zellkontakt mittels Fas-FasL zu vermitteln.

3.2.1 CpG-aktivierte PDCs führen zu einer deutlichen Steigerung der Granzyme B Produktion in aktivierten CD8+ T-Zellen

Ausgehend von dieser Überlegung sollte in einem ersten Versuch geklärt werden, ob PDCs die Mechanismen der direkten Zytotoxizität in CD8+ T-Zellen induzieren können. Hierfür wurden wiederum aus PBMCs die unterschiedlichen Subpopulationen, also PDCs und CD8+ T-Zellen isoliert und nach 48-stündiger Vorinkubation mit CpG-ODN und anschließender Waschung in Kultur gegeben. Nach weiteren 48 Stunden wurde dann in den Überständen mittels ELISA der GranzymeB-Spiegel bestimmt.

Ähnlich den Ergebnissen zur Induktion von IFN- γ durch PDCs zeigte sich auch in diesen Versuchen, dass die alleinige Anwesenheit von PDCs zu einem deutlichen Anstieg der GranzymeB Sekretion in aktivierten CD8+ T-Zellen führt. Wie auch bei den IFN- γ Messergebnissen zeigte sich jedoch eine deutliche intraindividuelle Streuung der Messwerte, so dass das Kriterium der Signifikanz nicht erreicht wurde. Analog zu den IFN- γ Messwerten zeigte sich auch in diesem Versuch ein deutlicher Anstieg der GranzymeB-Sekretion, sobald die plasmazytoide dendritische Zelle zusätzlich mit dem für ihren TLR9 Rezeptor spezifischen CpG-Oligonukleotid stimuliert wurde (siehe Abb. 7), n=8, p<0,04.

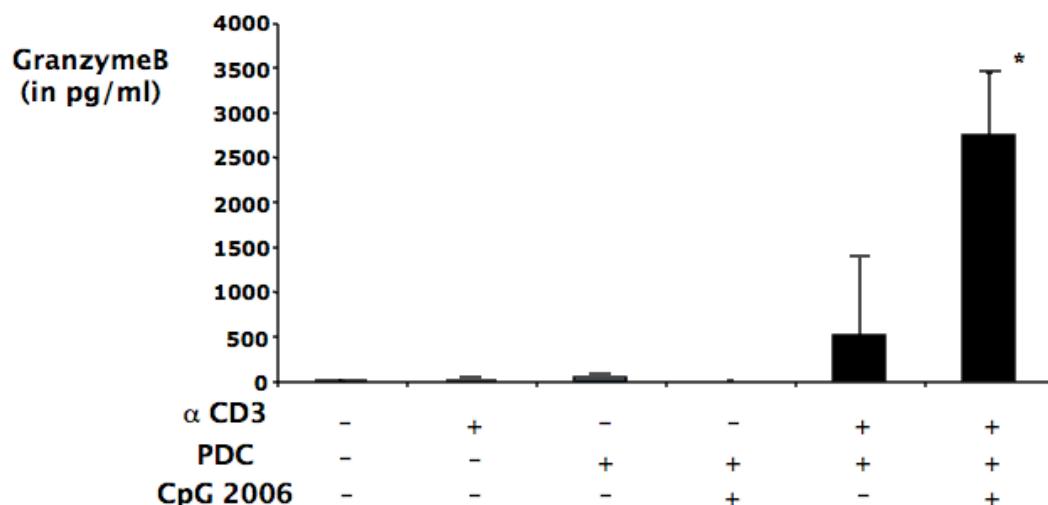


Abb. 7: GranzymeB Produktion in CD8-positiven T-Lymphozyten in Abhängigkeit verschiedener Stimuli.
 Wie auch bei IFN- γ zeigt sich ein signifikanter Anstieg der GranzymeB Produktion in der Kokultur von, mittels CpG-ODN 2006 (3 μ g/ml) aktivierten, PDCs mit durch CD3 Beads (200 μ l/100 Mio. Zellen) über den TZR stimulierten T-Lymphozyten (n=8), p<0,04.

3.2.2. Nur die aktivierte PDC ist in der Lage Granzyme B in CD8+ T-Zellen zu induzieren

Da dieses Ergebnis gerade im Hinblick auf eine spätere klinische Nutzung im Rahmen einer Zell-basierten Therapie mit dendritischen Zellen von Bedeutung ist, sollten in einem anschließenden Versuch mögliche Unterschiede der zwei DC Subtypen herausgearbeitet werden. Hierfür wurden wie im vorherigen Versuch aus PBMCs die jeweiligen Zellpopulationen isoliert, entsprechend des vorherigen Versuches inkubiert und nach 48 Stunden in den Überständen der GranzymeB-Spiegel mittels ELISA gemessen.

Überraschenderweise zeigte sich, dass weder nicht aktivierte, noch die aktivierte MDCs in dem gewählten Versuchsaufbau in der Lage waren, in den aktivierte CD8+ T-Zellen GranzymeB zu induzieren (siehe Abb. 8). Somit war in diesem Versuchsaufbau die PDC der MDC in der Induktion der zytotoxischen Markers GranzymeB deutlich überlegen (n=15), $p<0.001$.

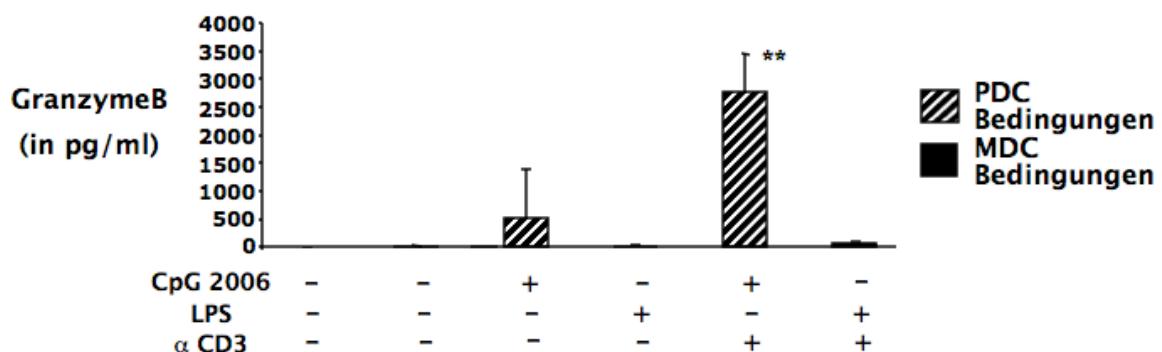


Abb. 8: Vergleich der GranzymeB Produktion CD8-positiver T-Lymphozyten in Kokultur mit MDCs und PDCs.

Während mittels CpG-ODN 2006 (3 μ g/ml) vorinkubierte PDCs in der Lage sind hohe Mengen von IFN- γ in insbesondere mittels CD3 Beads (200 μ l/100 Mio. Zellen) aktivierte CD8-positiven T-Lymphozyten zu induzieren, können dies sowohl native, als auch mittel LPS (100 ng/ml) vorinkubierte MDCs nicht (n=15), $p<0,001$.

3.2.3. Die lytische Aktivität von aktivierte CD8+ T-Zellen wird durch CpG-stimulierte PDCs gesteigert

Ausgehend von diesen Befunden sollte in einem weiteren Versuch untersucht werden, ob PDCs in der Lage sind, in aktivierterem Zustand, Einfluss auf die lytische Aktivität einer aktivierte CD8+ T-Zelle zu nehmen. Da in dem Versuchsaufbau polyklonale CD8+ T-Zellen

eingesetzt wurden, um möglichst physiologische Konditionen zu erreichen, konnte ein klassischer Antigen-abhängiger Lyseversuch nicht durchgeführt werden. Stattdessen wurde der etablierte und mehrfach validierte CD107 Degranulationsassay angewandt. Betts et al. konnten 2002 zeigen, dass die lytische Aktivität einer Effektorzelle direkt mit ihrer Expression des CD107a und CD107b Rezeptors korreliert. Dieser Rezeptor kann in fast allen granulären Membranen gefunden werden und wird beim Vorgang der Degranulation aus dem Inneren der Zelle und der Vesikel an die Oberfläche der Effektorzelle gebracht. Seine Funktion für die Degranulation ist bisher nicht einwandfrei geklärt. Es wird jedoch eine protektive Funktion gegenüber den zu sezernierenden Stoffen postuliert [Petes, 1991].

Es wurden aus PBMCs sowohl MDCs, wie auch PDCs isoliert und entsprechend der vorherigen Versuche mit den für ihre PRRs spezifischen Stimuli für 48 Stunden inkubiert. Abweichend von den anderen Versuchen wurden diese vorinkubierten Zellen dann mit frisch isolierten CD8+ T-Zellen desselben Spenders in Anwesenheit eines Antikörpers gegen CD107 für weitere 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss daran wurde dann zu einer Kumulierung des Antikörpers für weitere 5 Stunden ein Sekretionshemmer hinzu gegeben und nach mehrmaliger Waschung die Zellen durch eine Fixation auf den intrazellulären FACS Vorgang vorbereitet. Der von den 48 Stunden abweichende Inkubationszeitraum von 24 Stunden wurde deshalb so gewählt, da Vorversuche gezeigt hatten, dass sowohl der Sekretionsprozess des IFN- γ , wie auch des Granzyme B erst im Zeitraum zwischen der 24. und der 48. Stunde statt finden (siehe Abb. 9 und Abb. 10), jeweils $n=6$, $p<0.001$.

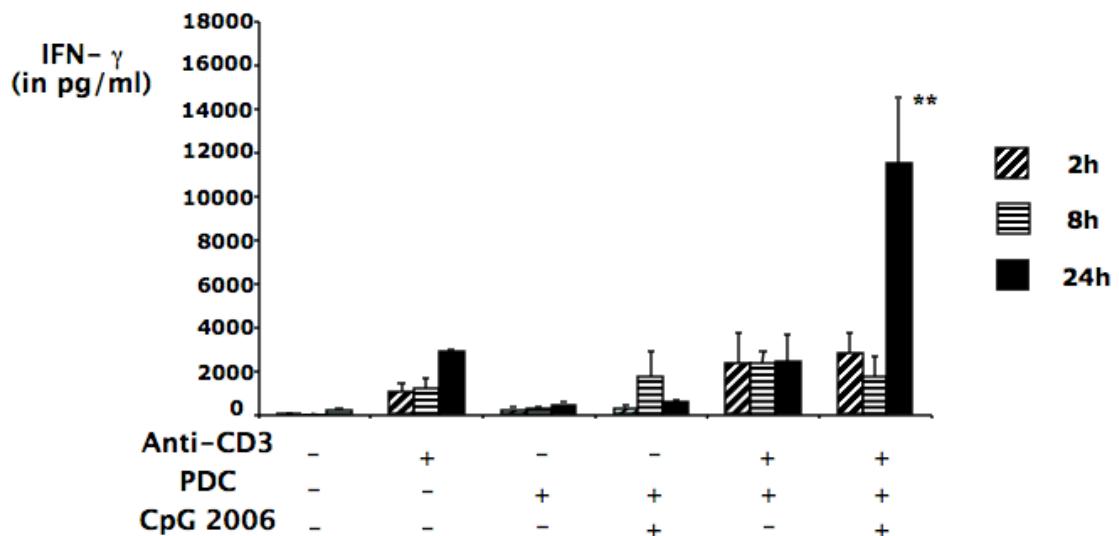


Abb. 9: Die Sekretion von INF- γ durch mittels CD3 Beads stimulierten (200 μ l/100 Mio. Zellen) CD8-positiven T-Lymphozyten beginnt zwischen der acht- und vierundzwanzigsten Stunde nach KoKultur mit durch CpG-ODN 2006 (2 μ g/ml) aktivierter PDCs (n=6), p<0,001. In den nach zwei- wie auch nach acht Stunden abgenommenen Überständen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der INF- γ Sekretion zu den Kontrollbedingungen ohne Stimulation (n=6).

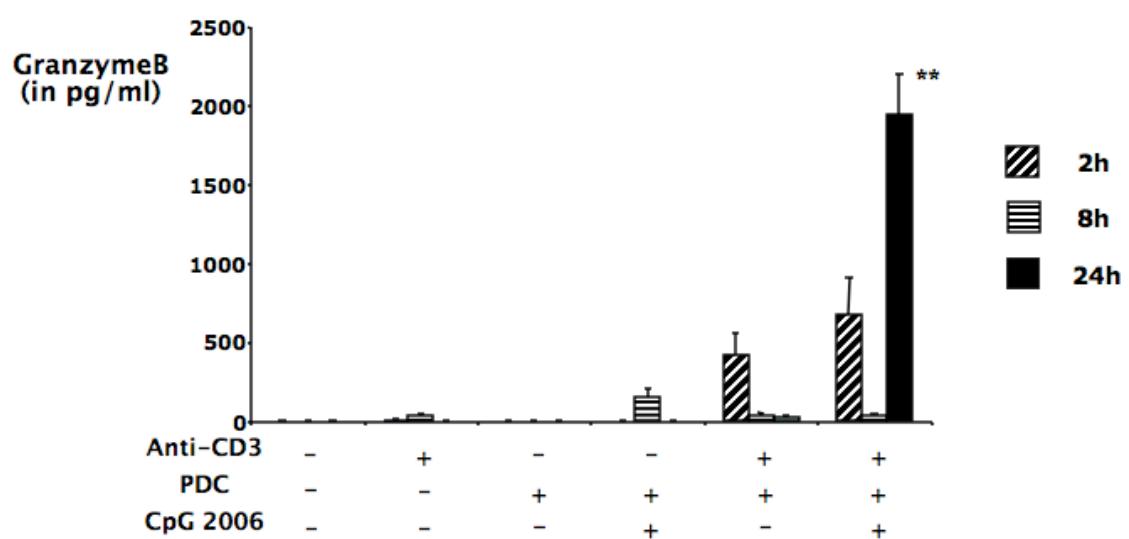


Abb. 10: Ein signifikanter Anstieg der Produktion von GranzymeB nach KoKultur von mittels CD3 Beads (200 μ l/100 Mio. Zellen) stimulierten CD8-positiven T-Lymphozyten mit für 48h mit CpG-ODN 2006 (3 μ g/ml) vorinkubierten PDCs ist bereits nach 24h im Überstand nachweisbar (n=6), p<0,001.

Hierbei zeigte sich, dass je nach Aktivierungszustand der CD8+ T-Zellen das Niveau zwischen 1% bis 15% CD107 positiven CD8+ T-Zellen lag, wobei es bei der aktivierten PDC zu einem deutlichen Anstieg des Prozentsatzes der CD 107 positiven CD8+ T-Zellen auf das Doppelte kam (siehe Abb. 11). Somit konnte gezeigt werden, dass sich die zytotoxische Aktivität der CD8+ T-Lymphozyten nach 24 Stunden Ko-Kultur mit durch CpG ODN aktivierten PDCs signifikant erhöhte (n=8)

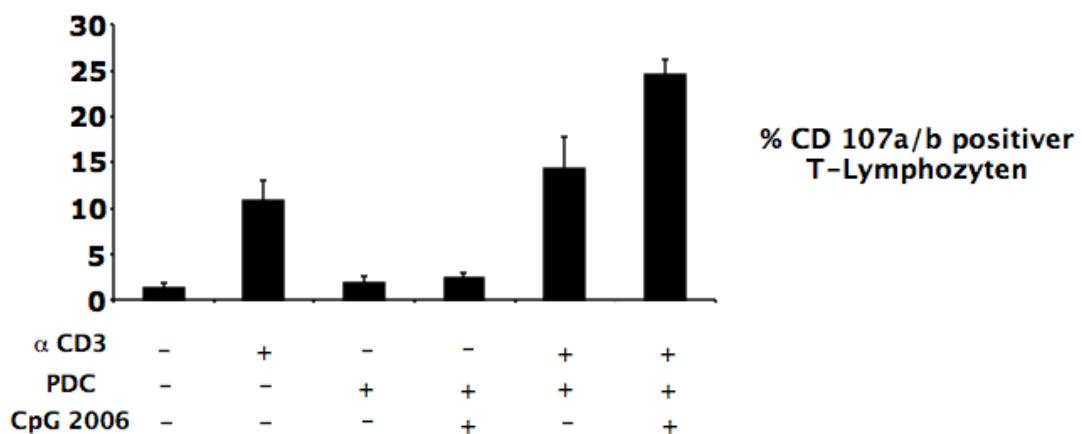


Abb. 11: Induktion von Zytotoxizität in CD8-positiven T-Lymphozyten durch aktivierte PDCs.

Mittels CpG-ODN 2006 (3 μ g/ml) voraktivierte PDCs induzieren in mittels CD3 Beads (200 μ l/100 Mio. Zellen) stimulierten CD8-positiven T-Lymphozyten eine beinahe verdoppelte Zytotoxizität/Zahl CD 107a/b positiver T-Lymphozyten, als insbesondere in der Kontrollbedingung, in der CD8-positive T-Lymphozyten nur mittels CD3 Beads über ihren TZR stimuliert werden (n=8). Es zeigt sich nur ein geringer nicht signifikanter Anstieg der Zahl CD107a/b positiver T-Lymphozyten im Vergleich der Bedingungen mittels CD3 Beads stimulierten CD8-positiven T-Lymphozyten in Anwesenheit nicht aktiverter PDCs und deren Abwesenheit.

3.2.4. PDCs steigern die Zytotoxizität in aktivierte CD8+ T-Lymphozyten deutlicher als MDS

Des Weiteren zeigte sich, dass MDCs entsprechend den Ergebnissen bei den Granzyme B-, wie auch bei IFN- γ -Spiegeln, eine deutlich geringere Steigerung des Prozentsatzes an CD 107a/b positiven Zellen bewirkten (siehe Abb. 12), n=15, p<0.001.

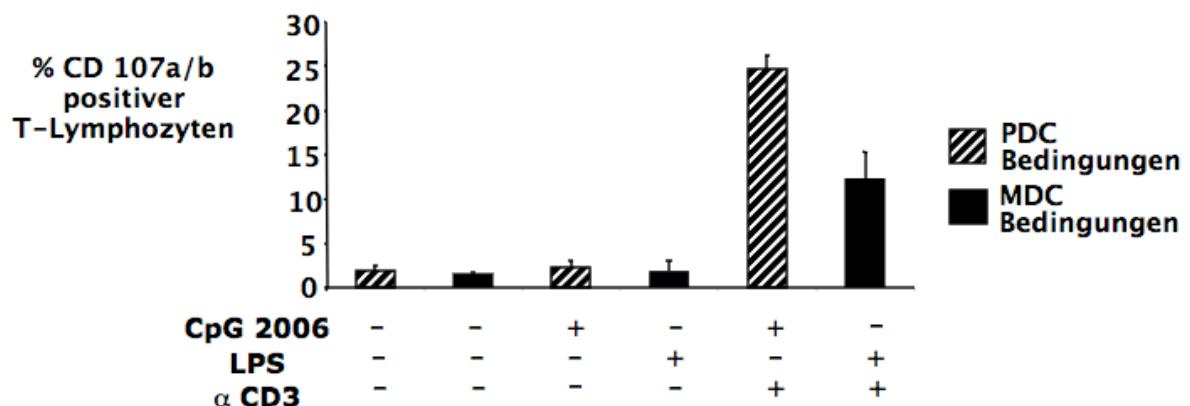


Abb. 12: Vergleich der Induktion zytotoxische CD8-positive T-Lymphozyten durch PDCs und MDCs.

Mittels LPS (100 ng/ml) vorinkubierte MDCs sind in der Lage zytotoxische CD8-positive T-Lymphozyten zu induzieren (n=15), $p<0,05$. Mittels CpG-ODN 2006 (3 μ g/ml) vorinkubierte PDCs zeigen jedoch eine signifikant höhere Potenz in der Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten wenn diese mittels CD3 Beads (200 μ l/ml) stimuliert werden (n=15), $p<0,001$.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren und mögliche Unterschiede in der Kinetik der Zellaktivierung zwischen MDCs und PDCs auszuschließen, wurde entsprechend den obigen Versuchsansätzen der Spiegel von GranzymeB nach 5-stündiger Inkubation zusätzlich mit dem Sekretionshemmer Brefeldin A intrazellulär mittels FACS Technologie gemessen. Auch hier zeigte sich, dass myeloide dendritische Zellen im Vergleich zu plasmazytoiden dendritischen Zellen nicht, oder nur in geringem Maße in der Lage sind, in aktivierten CD8+ T-Zellen GranzymeB zu induzieren (siehe Abb. 13).

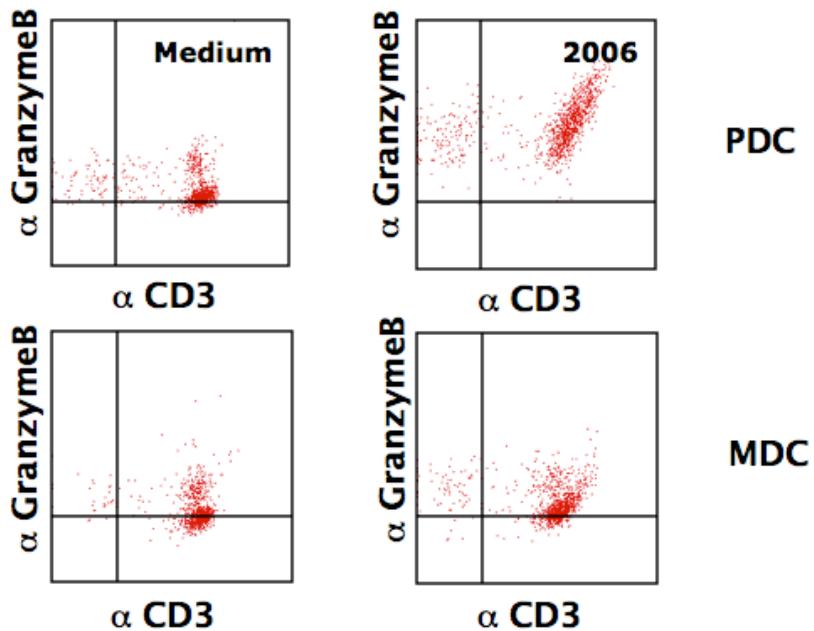


Abb. 13: Intrazelluläre FACS Färbung mit Antikörper gegen GranzymeB.
 Während sich in der Ko-Kultur von mittels CD3 Beads (200 µl/100 Mio. Zellen) stimulierten CD8-positiven T-Lymphozyten und mittels CpG-ODN 2006 (3 µg/ml) vorinkubierten PDCs, ein Anstieg der GranzymeB-produzierenden T-Lymphozyten zeigt, zeigen die mittels CD3 Beads (200µl/100 Mio. Zellen) stimulierten CD8-positiven T-Lymphozyten in der Ko-Kultur mit mittels LPS (100 ng/ml) aktivierten MDCs fast keinen Anstieg der GranzymeB Produktion.

3.3. Die PDC-vermittelte, Antigen-unabhängige Aktivierung von CD8+ T-Zellen wird durch direkten Zellkontakt vermittelt

Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten in der Vergangenheit zeigen, dass bei der Stimulation der PDC mit CpG-Oligonukleotiden eine große Gruppe an pro-inflammatorischen Genen reguliert wird. So wurde unter anderem eine Aufregulation der Expression von MHC Klasse II Molekülen, ICAM-1 und den kostimulatorischen Molekülen CD40, CD54, CD80, CD83 und CD86, sowie eine verstärkte Sekretion von IL-6, TNF- α , IFN- α und IL-8 berichtet [Hartmann et al. 1999, Kadokawa et al. 2001, Krug et al. 2001]. Basierend auf diesen Befunden, ist die Induktion der oben beschriebenen Effekte durch die aktivierte PDCs über zwei verschiedene Mechanismen, auf der einen Seite über lösliche Stoffe und auf der anderen Seite über einen direkten Zell-Zell-Kontakt, möglich. Es sollte deswegen untersucht werden, welcher der beiden Wege für das Auftreten dieser Effekte verantwortlich ist, und welche löslichen Stoffe oder Oberflächenmarker daran beteiligt sind.

Hierfür wurden entsprechend den obigen Ansätzen aus PBMCs PDCs isoliert, für 48 Stunden mit ihren spezifischen Stimuli vorinkubiert und dann mit frisch isolierten CD8+

T-Zellen desselben Spenders inkubiert. Je nachdem welcher Übertragungsweg untersucht werden sollte, wurden dabei entweder PDCs und CD8+ T-Zellen mittels Transwells, die eine freie Zirkulation der löslichen Stoffe zwischen den verschiedenen Zellpopulationen zuließen, getrennt, oder aber es wurden während der gemeinsamen Inkubation beider Zellpopulationen mittels Antikörpern einzelne lösliche Zytokine (IL-12, IL-15, IL-18 und IFN- α), die einen entsprechenden Effekt hätten vermitteln können, spezifisch geblockt.

3.3.1. Die Inhibierung von IL-12, IL-15, IL-18 und IFN zeigt keine Hemmung der PDC-vermittelten Ko-Stimulation von Aktivierung CD8+ T-Zellen

In der Literatur werden IL-12, IL-15 und IL-18 häufig als potente, wenn nicht sogar die potentesten Induktoren der IFN- γ Produktion in T-Zellen diskutiert. Überraschenderweise zeigte sich, dass es bei einer Blockierung sowohl der Zytokine IL-12, IL-15 und IL-18 auf aktivierten T-Zellen in Anwesenheit aktiver PDCs zu keiner signifikanten Verminderung der IFN- γ Spiegel in den Überständen kam (jeweils n=6). Es zeigte sich sogar, dass es in den Versuchsbedingungen, in denen IL-15 und IL-18 mit Antikörpern neutralisiert waren zu einem signifikanten Anstieg des IFN- γ Spiegels kam (siehe Abb. 14-16), ohne, dass in den PDC-freien Kontrollbedingungen IFN- γ messbar war. Somit konnte eine Beteiligung dieser TH1-Schlüsselzytokine in der indirekten PDC-abhängigen Aktivierung von CD3-stimulierten CD8+ T-Zellen ausgeschlossen werden.

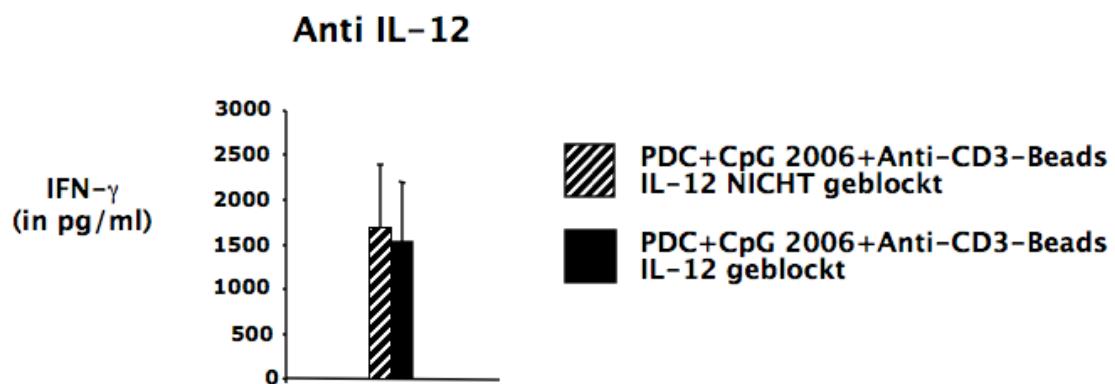


Abb. 14: Die Blockierung von IL-12 durch IL-12 Antikörper (2 μ g/ml) bei einer Ko-Kultur vonmittels CpG-ODN 2006 (3 μ g/ml) für 48h vorinkubierten PDCs mit über ihren TZR mittels CD3 Beads (200 μ l/100 Mio. Zellen) stimulierten CD8-positiven T-Lymphozyten zeigte keine Verringerung der IFN- γ Produktion der CD8-positiven T-Lymphozyten (n=6).

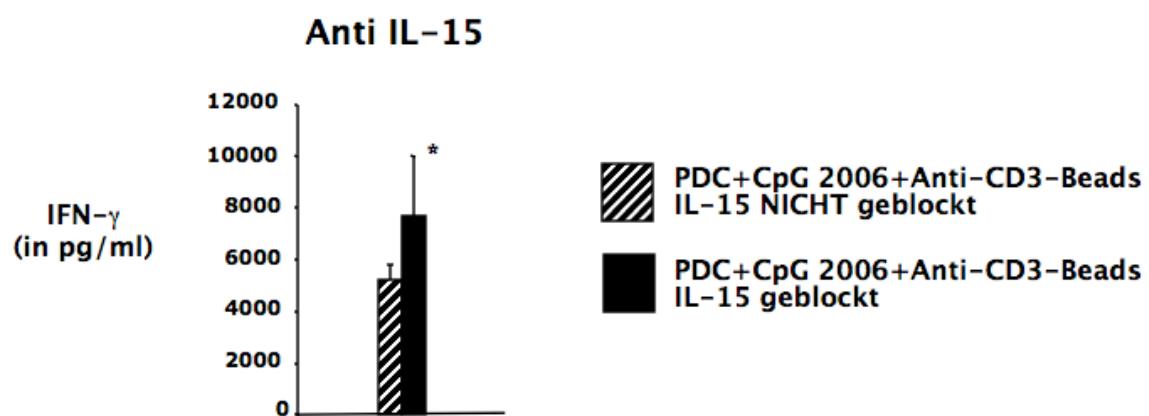


Abb. 15: Bei der Blockierung von IL-15 durch einen IL-15 Antikörper (2 μ g/ml) bei mittels CD3 Beads (200 μ l/100 Mio. Zellen) über den TZR stimulierten CD8-positiven T-Lymphozyten in Ko-Kultur mit durch CPG-ODN 2006 (3 μ g/ml) für 48h vorinkubierten PDCs zeigt sich ein leichter Anstieg der IFN- γ Produktion (n=6), $p<0,05$.

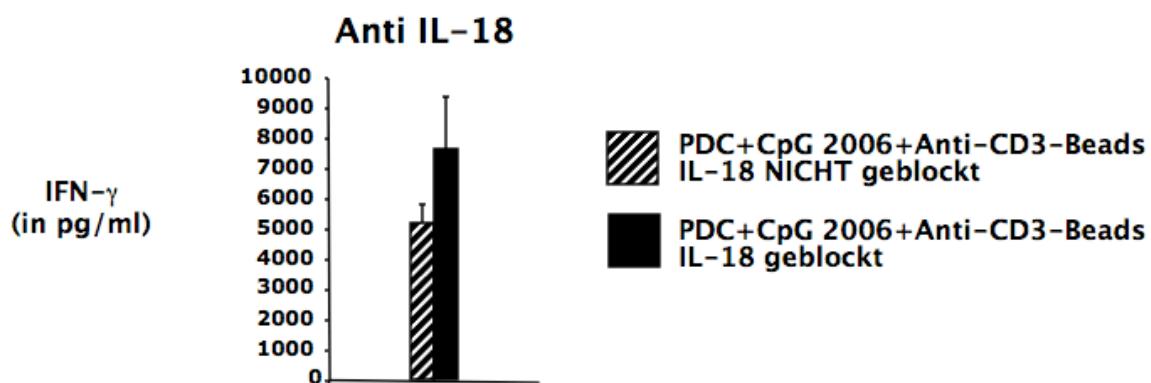


Abb. 16: Bei einer Blockierung von IL-18 durch IL-18 Antikörper (2 μ g/ml) zeigt sich in der Ko-Kultur von für 48h mit CpG-ODN 2006 (3 μ g/ml) vorinkubierten PDCs und über den TZR durch CD3 Beads (200 μ l/100 Mio. Zellen) stimulierten CD8-positiven T-Lymphozyten ein nicht signifikanter Anstieg der IFN- γ Produktion der aktivierten CD8-positiven T-Lymphozyten (n=6).

Da IFN- α nicht direkt, jedoch indirekt über IL-12 auf die IFN- γ Produktion Einfluss nehmen kann, sollte in einem weiteren Schritt der Einfluss von IFN- α auf die IFN- γ Sekretion untersucht werden. Hierfür wurde analog der obigen Blockierungsansätze in den Überständen nach 48-stündiger Inkubation der Zellpopulationen, unter Anwesenheit von blockierenden IFN- α Antikörpern sowie Fusionsproteinen, die IFN- γ Spiegel gemessen.

Hierbei zeigt sich, dass auch die Blockierung von IFN- α keinen Einfluss auf die Produktion von IFN- γ durch die T-Lymphozyten hat (siehe Abb. 17), n=4.

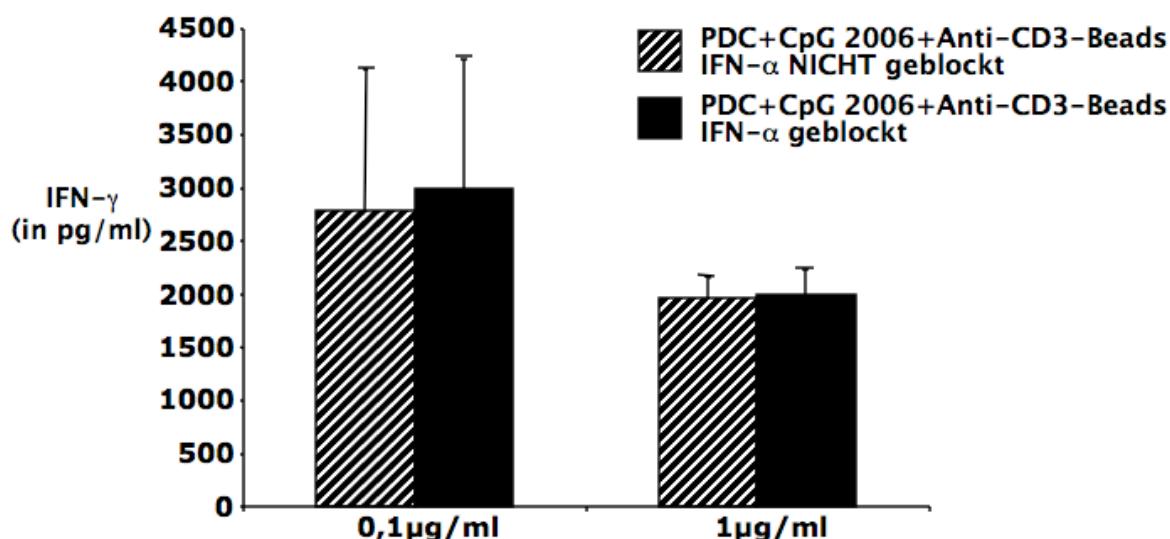


Abb. 17: Eine Blockierung von IFN- α durch eine Kombination aus IFN- α Antikörpern und IFN- α Fusionsprotein (je 0,1 0,1 μ g/ml und 1 μ g/ml) in einer Ko-Kulturs aus für 48h mit CpG-ODN 2006 (3 μ g/ml) vorinkubierten PDCs und über den TZR durch CD3 Beads (200 μ l/100 Mio. Zellen) stimulierten CD8-positiven T-Lymphozyten zeigt keine signifikante Änderung der Produktion von IFN- γ durch die CD8-positiven T-Lymphozyten (n=4).

3.3.2. Die Induktion von INF- γ in CD8+ T-Zellen durch PDCs wird über Zell-zu-Zell Kontakt vermittelt

Aus den obigen Ergebnissen, wie auch den Ergebnissen, die Marschner et al. anhand der NKT-Zelle zeigen konnten, sollte nun untersucht werden, ob die oben beschriebenen Effekte auch bei der CD8+ T-Zelle über einen direkten Zell-zu-Zell Kontakt hervorgerufen werden. In einem ersten Schritt wurden deshalb die, bei den vorherigen Versuchen entsprechend isolierten Zellen, durch ein Transwell voneinander getrennt (siehe Abb. 18), und nach 48 Stunden der IFN- γ Spiegel im Überstand mittels ELISA gemessen.

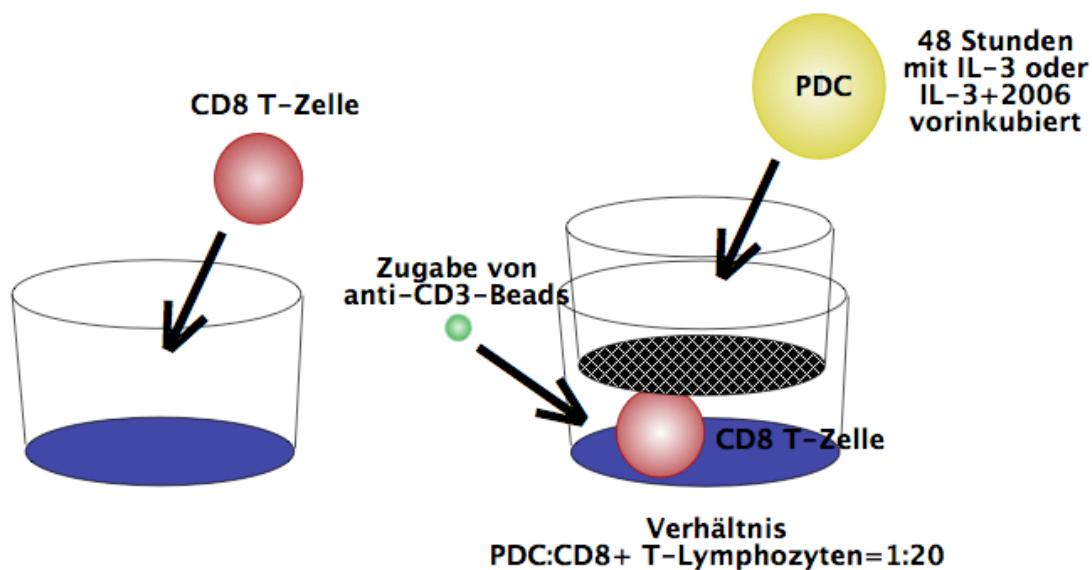


Abb. 18: Schema-Zeichnung des Transwell-Versuchsaufbaus.
 Nach einer 48-stündigen Vorinkubation der PDCs mit IL-3 (10 ng/ml) und falls benötigt mit CpG-ODN 2006 (3 µg/ml) werden diese mit frisch gewonnenen CD8-positiven T-Lymphozyten desselben Spenders für 48h in Kultur gegeben. Hierbei werden PDCs und T-Lymphozyten durch ein Transwell räumlich voneinander getrennt, so dass es nur zu einem Austausch löslicher Faktoren kommt.

Es zeigte sich, dass, durch die Trennung der plasmazytoiden dendritischen Zellen und der CD8+ T-Lymphozyten, sich der Effekt einer IFN- γ -Sekretion, der bei einer Ko-Kultur stimulierter PDCs mit über ihren TZR stimulierten CD8+-T-Lymphozyten beobachtet werden konnte, vollkommen eliminieren ließ (siehe Abb. 19), $n=8$, $p<0.001$.

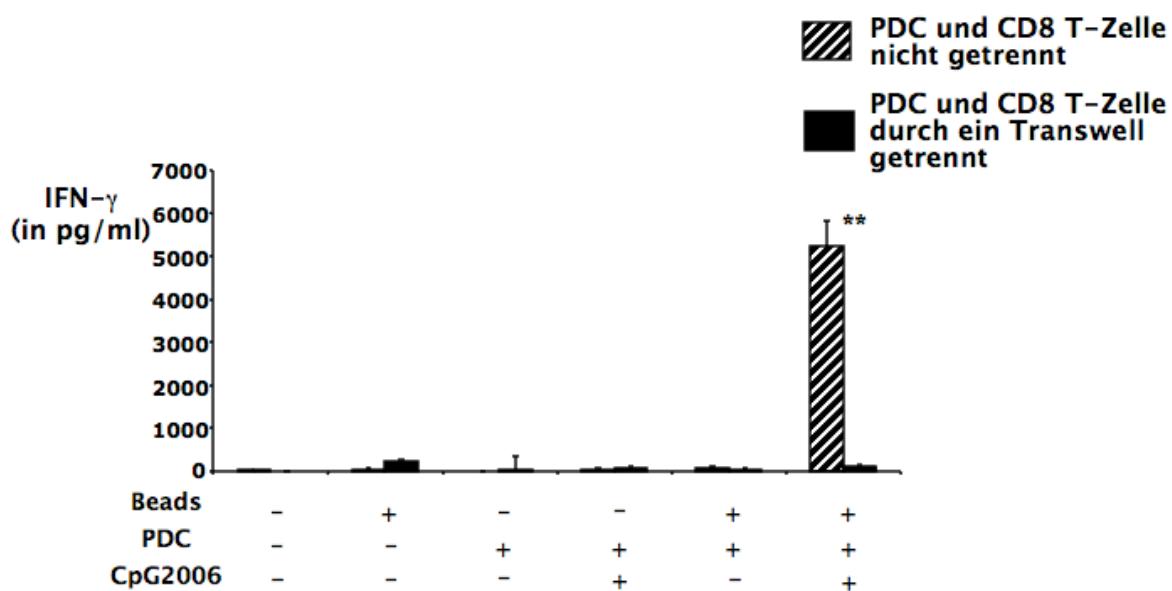


Abb. 19: Werden CD8-positive, zuvor mittels CD3 Beads (200 µl/ 100 Mio. Zellen) über den TZR aktivierte, T-Lymphozyten von den mittels CpG-ODN 2006 (3 µg/ml) aktivierten PDCs getrennt, kommt es zu einem kompletten Verlust der IFN- γ Produktion durch die CD8-positiven T-Lymphozyten (n=6), $p<0.001$.

Um zu zeigen, dass es für die beobachteten Effekte tatsächlich eines Zellkontakte zwischen PDCs und CD8+ T-Lymphozyten bedarf, und dieser nicht von etwaigen löslichen Stoffen mit einer kurzen Reichweite verursacht wird, sollte in einem Folgeversuch gezeigt werden, dass es durch eine räumliche Trennung der plasmazytoiden dendritischen Zelle und der CD8+ T-Zelle tatsächlich nicht zu einer Sekretion von lytischen Stoffen wie GranzymeB kommt. Hierzu wurden in zwei Ansätzen einmal die plasmazytoiden dendritischen Zelle getrennt von der CD8+ T-Zelle und einmal zusammen mit dieser für 24 Stunden inkubiert. Nach einer anschließenden weiteren Inkubation mit dem Sekretionshemmer Brefeldin A für zusätzliche 5 Stunden wurde mittels FACS Technologie intrazellulär das Vorhandensein von GranzymeB untersucht. Hierbei zeigte sich, dass ein Zell-zu-Zell-Kontakt für die Induktion von GranzymeB in CD8+ T-Zellen eine notwendige Bedingung darstellte (siehe Abb. 20). Die Expressionsstärke des GranzymeB entsprach in den Transwellversuchen des Signals der Kontrollbedingungen, wie dies bei einem Kontakt der plasmazytoiden dendritischen Zelle mit der T-Zelle der Fall war.

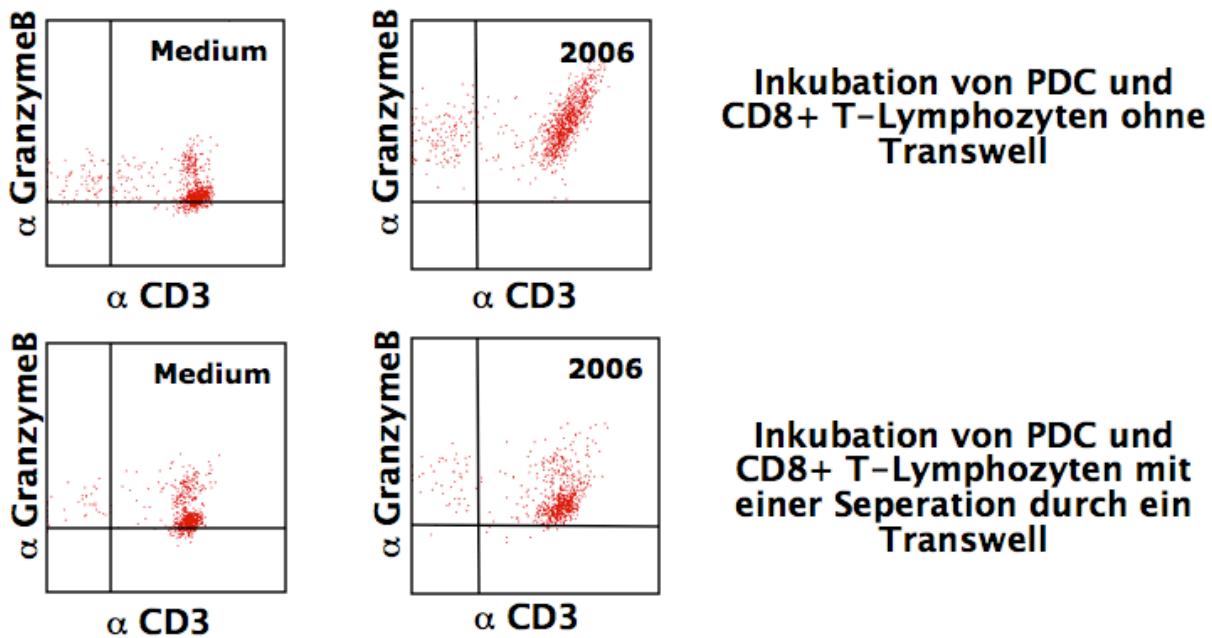


Abb. 20: Intrazelluläre FACS Färbung von GranzymeB.
 Bei einer räumlichen Trennung von mittels CpG-ODN 2006 (3 µg/ml) aktivierten PDCs von den mittels CD3 Beds (200 µl/100 Mio. Zellen) über ihren TZR stimulierten CD8-positiven T-Lymphozyten kommt es zu einem deutlichen Abfall der intrazellulären Konzentration von GranzymeB in den CD8-positiven T-Lymphozyten.

3.3.3 Die Inhibition von CD28 und OX40L führen zu einer deutlichen Reduktion der Antigen-unabhängigen Aktivierung von CD8+ T-Zellen durch die PDC

Da die vorausgegangenen Ergebnisse einen Zell-zu-Zell-Kontakt als notwendige Bedingung sehr wahrscheinlich machten, sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit ein möglicher Rezeptor gefunden werden, der für diesen CpG-abhängigen Effekt verantwortlich ist. Marschner et al. konnten 2005 zeigen, dass unter anderem bei einer Stimulation einer NKT-Zelle durch aktivierte plasmzytoiden dendritische Zellen eine Interaktion zwischen OX40 und OX40 Ligand eine notwendige Bedingung darstellte. Da in der Literatur von zahlreichen Arbeitsgruppen die Rolle der OX40 Interaktion mit ihrem Rezeptor für die Produktion von IFN- γ beschrieben wurde, und bekannt ist, dass es unter der Stimulation der plasmzytoiden dendritischen Zelle zu einer Hochregulation von OX40L kommt, sollte nun untersucht werden, ob dieser Rezeptor auch bei den oben beschriebenen Effekten eine Rolle spielt. Hierfür wurden analog der Zytokin-Blockierungs-Ansätze die vorinkubierten plasmzytoiden dendritischen Zellen mit den frisch isolierten CD8+ T-Lymphozyten desselben Spenders in Anwesenheit von blockierenden OX40 Rezeptor Antikörpern für 48 Stunden inkubiert, und

anschließend in den Überständen der IFN- γ -Spiegel mittels ELISA gemessen. Während sich in den Bedingungen mit einem Kontrollantikörper der bekannte kostimulatorische Effekt zeigte, konnte in den Bedingungen, in denen OX40 geblockt wurde, eine Verminderung des Effekts auf ca. 29% des „Normalwertes“ beobachtet werden (siehe Abb. 21), n=6, p<0.001. Es war dennoch immer noch ein Rest des durch CpG-Oligonukleotid induzierten Effekts erkennbar, so dass von einer Beteiligung weiterer Oberflächenproteine ausgegangen werden musste, die im Folgenden untersucht werden sollten.

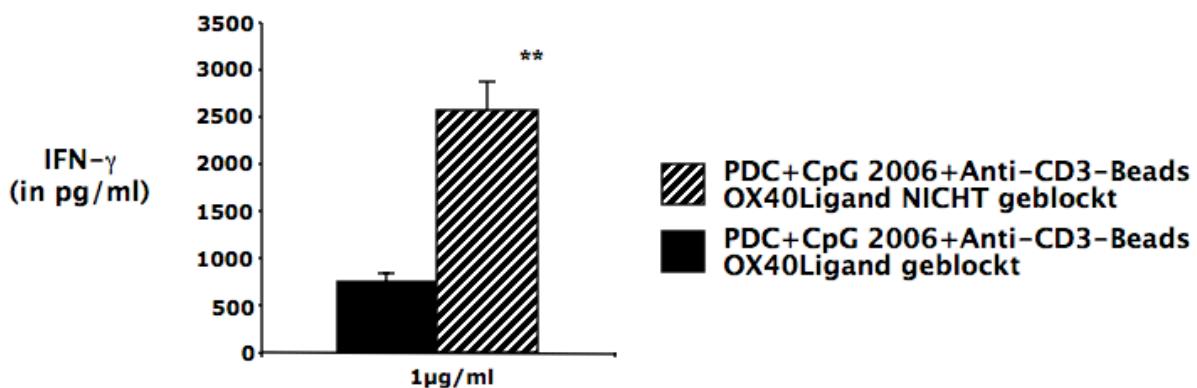


Abb. 21: Eine Blockierung des OX40Liganden durch einen blockierenden Antikörper (1 μ g/ml) zeigt in der Ko-Kultur von mittels CpG-ODN 2006 (3 μ g/ml) für 48h vorinkubierten PDCs und über den TZR durch CD3 Beads (200 μ l/100 Mio. Zellen) stimulierten CD8-positiven T-Lymphozyten eine signifikante Verringerung der IFN- γ Produktion der CD8-positiven T-Lymphozyten (n=6), p<0.001.

Hartmann et al beschrieben 1999, dass es unter der Stimulation von plasmazytoiden dendritischen Zellen zu einer Aufregulation von CD80, wie auch CD86 auf der Oberfläche der plasmazytoiden dendritischen Zelle kommt. Aus zahlreicher Literatur ist bekannt, dass es sich bei CD80, wie auch CD86, um einen essentiellen kostimulatorischen Faktor bei der Aktivierung von T-Zellen handelt. CD80, wie auch CD86 sind hierbei mit dem auf CD4+ T-Lymphozyten zu ca. 80% und auf CD8+ T-Lymphozyten zu ca. 40% exprimierten Oberflächenmarker CD28 an der Bildung der immunologischen Synapse beteiligt. Deshalb sollte in einem weiteren Schritt dieser Arbeit untersucht werden, ob dieser Mechanismus auch an der Induktion des oben beschriebenen CpG-induzierten Effekts beteiligt ist. Hierfür wurde ein gegen CD28 gerichteter, blockierender Antikörper, der selbst keine aktivierende Aktivität zeigte, verwendet, um sowohl die Wirkung von CD80, wie auch CD86 bei einer

möglichen Aktivierung CD8+ T-Lymphozyten zu unterdrücken. Hierbei konnte ein deutlicher Rückgang des INF- γ Spiegels in den Überständen beobachtet werden. Dennoch war weiterhin eine gegenüber der Kontrollbedingung gesteigerte IFN- γ Produktion in CD8+ T-Lymphozyten nachzuweisen (siehe Abb. 22), n=6, p<0.001.

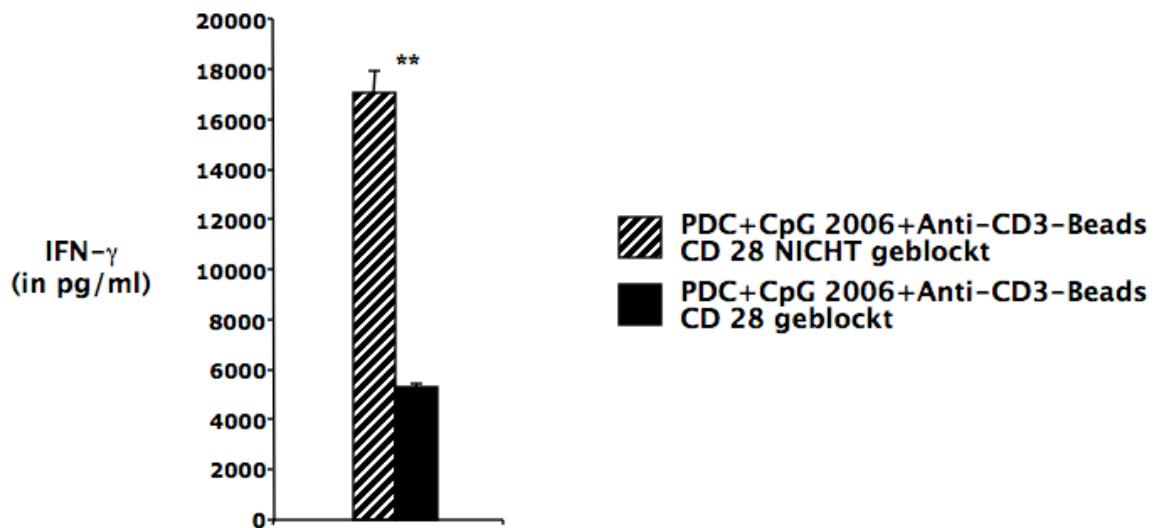


Abb. 22: Die Blockierung des Oberflächenmoleküls CD 28 (Anti-CD28 Antikörper 2 μ g/ml) auf den durch ihren TZR mittels CD3 Beads (200 μ l/100 Mio. Zellen) stimulierten CD8-positiven T-Lymphozyten zeigt in der Ko-Kultur mit den, durch CpG-ODN 2006 (3 μ g/ml) für 48h vorinkubierten, PDCs eine signifikante Reduktion der IFN- γ Produktion gegenüber der Kontrolle ohne Blockierung von CD 28 (n=6), p<0,001.

4. Diskussion

4.1. Übersicht über die experimentellen Befunde

Die Stimulation naiver CD8+ T-Lymphozyten durch CpG Oligonukleotide

CD8+ T-Lymphozyten stellen einen wichtigen Bestandteil der zellulären Immunantwort dar. Eine direkte Stimulation des naiven T-Lymphozyten durch CpG-Oligonukleotide ist nicht möglich, da Analysen der TLR 1-10 Expression in PBMCs gezeigt haben, dass naive CD8+ T-Lymphozyten nur eine geringe bis fehlende Expression von TLR9 aufweisen. Zudem wird generell in Frage gestellt, ob TLRs auf T-Lymphozyten eine funktionelle Relevanz besitzen. Dementsprechend zeigen aufgereinigte naive- wie auch über ihren CD3-Rezeptor stimulierte CD8+ T-Lymphozyten ebenfalls keine Sensitivität gegenüber CpG-ODNs [Hornung, 2002].

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass es in PBMCs bei Peptid-spezifischen- und *memory* CD8+ Zellen sowie bei NKT-Zellen zu einem deutlichen Anstieg der IFN- γ Produktion kommt, sobald die gesamte PBMC-Kultur mit CpG-ODNs stimuliert wird. Hierbei zeigte sich, dass ODN-Typ CpG A, welches sich durch eine Induktion höherer Spiegel von Typ-I-IFN auszeichnet, einen stärkeren aktivierenden Effekt als ODN-Typ CpG B, das eher eine ausreifende Wirkung auf PDCs hat. Eine zusätzliche Kostimulation der Kultur mit dem für die jeweilige Zelle spezifischem Antigen konnte den beobachteten Effekt steigern [Marschner, 2002].

Der den Effekt verursachende Mechanismus wird durch eine Interaktion des Peptid-spezifischen- oder des Memory-CD8 T-Lymphozyten sowie der NKT-Zelle mit der PDC erklärt, denn es zeigte sich, dass eine Depletion der PDC innerhalb der PBMCs zu einem kompletten Verlust dieses Effekts führte. Eine alleinige Depletion der MDC zeigte nur eine geringe bis gar keine Verminderung der IFN- γ Produktion.

Ein CD8+ T-Lymphozyt, wie auch die oben beschriebenen Zellen, können ein Antigen nur dann erkennen, wenn es von einer APC im Kontext mit CD1a-c oder CD1d präsentiert wird. Bereits früher wurde vermutet, dass die Zielzellen des CpG Motivs (B-Zellen und PDCs) in der Lage sind über CD1a-c oder bei der NKT-Zelle über CD1d der Effektorzelle ein Antigen zu präsentieren und gleichzeitig nach Aktivierung durch CpG-ODNs über TLR9 eine Kostimulation auszuüben. Genom-weite Transkription Analysen der naiven, wie auch der aktivierte PDC haben jedoch gezeigt, dass diese nicht in der Lage sind Antigen mittels CD1a-c oder CD1d zu präsentieren, da diese nicht exprimiert werden. Die Antigen-präsentierende Zelle und die, das CpG-ODN erkennende, Zelle, die PDC, sind somit nicht identisch. Deshalb ist es erforderlich zur Untersuchung einer ko-stimulatorischen Aktivität der PDC und deren Wirkung auf den CD8+ T-Lymphozyten diesen vorab über einen zusätzlichen Stimulus zu aktivieren. In dieser Arbeit wurden hierfür CD3-besetzte Mikrobeads verwendet, die ihrerseits jedoch nicht oder nur in geringem Maße in der Lage sind in T-Lymphozyten eine INF- γ zu induzieren (siehe Ergebnisteil). Dieses System mag auf den ersten Blick unphysiologisch erscheinen, jedoch ermöglicht es eine Antigen-unabhängige, TZR-abhängige Stimulation von CD8+ T-Zellen.

Bisherige Arbeiten und Veröffentlichungen, die sich mit der Kostimulation und Aktivierung von Immunzellen durch mit CpG-ODN stimulierten PDCs auseinander setzten, legten die Vermutung nahe, dass lösliche Faktoren alleine oder aber in Kombination mit einem direkten Zellkontakt für die gesteigerte Sekretion von IFN- γ verantwortlich sind. Insbesondere das IFN- α wurde als wichtiger löslicher Faktor diskutiert.

Hierin unterscheidet sich die vorliegende Arbeit jedoch von den vorausgegangenen, denn anders als in den vorangegangenen Arbeiten erwies sich das CpG-ODN Typ A dem CpG-ODN-Typ B in der Induktion von IFN- γ nicht nur nicht gleichwertig, sondern sogar deutlich unterlegen. Diese auf den ersten Blick etwas verwunderliche Beobachtung lässt sich jedoch durch die verschiedenen Wirkungen der beiden CpG-ODNs auf die PDC gut erklären. CpG-ODN Typ A ist in der Lage sehr hohe Werte an IFN- α in der PDC zu induzieren. Die aktivierende Wirkung von IFN- α auf peptidspezifische- und *memory* T-Lymphozyten ist gut bekannt. Auf der anderen Seite zeigte sich eine stark hemmende Wirkung auf naive T-Lymphozyten. CpG-ODN-Typ B führt hingegen zu einer phänotypischen und funktionellen Ausreifung der PDC. Diese „ausgereiften“ PDCs exprimieren Antigen-präsentierende und kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86 und CD40) sowie den Reifemarker CD83. Außerdem erzeugt CpG-ODN-Typ B ein anderes Zytokinprofil als CpG-ODN-Typ A.

Transwell-Experimente wie auch Experimente mit blockierenden Antikörpern gegenüber diversen Zytokinen zeigten, dass lösliche Faktoren bei der Kostimulation naiver CD8+ T-Zellen durch aktivierte PDCs nur eine untergeordnete, oder sogar fast keine Rolle, spielten. Außerdem zeigten sowohl die Transwell-Experimente, wie auch die Experimente mit blockierenden Antikörpern, dass für die Induktion von IFN- γ ein direkter Zellkontakt zwischen PDCs und CD8+T-Lymphozyten erforderlich ist, da es nach Separierung der T-Lymphozyten von den PDCs zu einem fast vollständigen Verschwinden des beobachteten Effekts kam. Außerdem konnte mit Überständen von aktivierte PDCs bei isolierten naiven CD8+ T-Lymphozyten ohne, wie auch mit einer Aktivierung über ihren TCR, kein IFN- γ induziert werden (Daten nicht gezeigt).

Somit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass PDCs, obwohl sie nicht über CD1d für die Antigenpräsentation verfügen, in der Lage sind über einen direkten Zellkontakt Antigen-unabhängige CD8+ T-Lymphozyten immunologisch zu beeinflussen.

4.2. Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

4.2.1. Die Stimulation des CD8-positiven T-Lymphozyten durch die mit CpG-ODNs aktivierte PDC.

Aus früheren Arbeiten und Publikationen war bereits bekannt, dass die PDC nach ihrer Aktivierung durch CpG-ODN in der Lage ist bei peptidspezifischen- oder auch *memory* T-Zellen [Hornung et al. 2002] sowie bei NKT-Zellen [Marschner et al. 2005] eine INF- γ Sekretion zu induzieren. Eine direkte Umsetzung, der in diesen Veröffentlichungen

verwendeten Versuchsansätze war nicht möglich. Erstens zeigte sich das in den Publikationen verwendete CpG-ODN Typ A dem CpG-ODN Typ B deutlich unterlegen. Zweitens musste für den naiven CD8+ T-Lymphozyten ein Möglichkeit gefunden werden, diesen zu aktivieren, ohne jedoch dabei eine direkte IFN- γ Sekretion zu induzieren.

Zusätzlich zeigte sich in der Arbeit von Hornung et al. wie auch in der vorliegenden Arbeit (Daten nicht gezeigt), dass es zu einer Verminderung der Proliferation sowie der INF- γ Sekretion nach Stimulation der PDC mit einem CpG-ODN, bei naiven T-Zellen kam. Bereits 1999 zeigte Erickson et al., dass IFN- α auf naive T-Lymphozyten eine stark antiproliferative Wirkung hat, indem es einen Übergang der Zelle aus der G1-Phase in die S-Phase nach Stimulation des TCR unterbindet. Im Gegensatz hierzu führt IFN- α bei voraktivierten-, CD8+ T-Lymphozyten und NK-Zellen zu einer Steigerung der Zytotoxizität sowie bei memory CD8+ T-Lymphozyten zu einer selektiven Expansion [Biron et al. 1999], was sich auch mit den Beobachtungen von Marschner et al. und Hornung et al. deckt.

Um etwaige Wechselwirkung des INF- α mit den isolierten naiven CD8+ T-Lymphozyten zu vermindern, wurde in der vorliegenden Arbeit CpG-ODN Typ B verwendet. Im Gegensatz zu CpG-ODN Typ A induziert CpG-ODN Typ B in PDCs nur eine geringe Menge an IFN- α [Krug et al. 2001]. Es führt stattdessen neben einer starken B-Zellaktivierung zu einer phänotypisch und funktionellen Ausreifung, die sich durch eine bessere Apoptose-Resistenz und die Expression von kostimulatorischen Molekülen und Reifemarkern (CD80, CD83 sowie CD86 und CD40) sowie dem Chemokinrezeptor CCR7 auszeichnet [Rothenfusser et al. 2003].

Die unterschiedliche Wirkung der verschiedenen CpG-ODNs ist bisher noch nicht endgültig geklärt. Die größte Differenz in ihrer Wirkung zeigen CpG-ODN Typ A und Typ B, wie bereits oben beschrieben, in ihrer unterschiedlichen Fähigkeit INF- α zu induzieren. Kerkemann et al. beschrieb 2003, das CpG-ODN Typ A und Typ B verschiedene Signalkaskaden aktivieren. Es wird vermutet, dass Unterschiede in der Erkennung und der Aufnahme der CpG-ODN für die unterschiedliche Wirkung der CpG-ODNs verantwortlich sind. Struktur-Untersuchungen haben gezeigt, dass CpG-ODN Typ B nur in Form von Monomeren vorliegt, wohingegen CpG-ODN Typ A partikuläre, höhermolekulare Strukturen ausbildet. Ein Grund für die Ausbildung dieser höhermolekularen Strukturen sind die bei CpG-ODN Typ A vorkommenden Poly-G-Enden, sowie das im Zentrum vorkommende Palindrom. Über Wasserstoffbrückenbindungen können sich hierdurch intra- und intermolekulare Verbindungen ausbilden, die dazu führen, dass sich mehrere CpG-ODN Typ A zu komplexen Strukturen zusammenschließen. In der Literatur werden diese höhermolekularen Strukturen für die Fähigkeit, große IFN- α Mengen zu induzieren, verantwortlich gemacht. Verändert man

die Sequenz der Poly-G-Enden oder des zentralen Palindroms, so kommt es zu einem deutlichen Abfall der INF- α Sekretion.

Messungen in Überständen von, durch CpG-ODNs stimulierten, PDCs zeigten jedoch auch, dass, wie bereits von Rothenfusser et al. 2002 beschrieben, auch CpG-ODN Typ B in der Lage ist IFN- α zu induzieren. Die erreichten Spiegel sind deutlich geringer als bei, durch CpG-ODN Typ A stimulierten, PDCs [Krug et al. 2001]. Diese Spiegel dürften aber, wie von Erickson et al. 1999 beschrieben, ausreichen, um eine antiproliferative Wirkung auf naive CD8+ T-Lymphozyten auszuüben.

Eigene Untersuchungen zeigten, dass die durch CpG-ODN Typ B induzierte IFN- α Produktion in den ersten 48 Stunden nach Stimulation der PDC durch das CpG-ODN erfolgt, wobei im Anschluss keine IFN- α Sekretion mehr zu beobachten ist. Um etwaige sekundären Einflüsse [Erickson et al. 1999], von IFN- α auf naive CD8+ T-Lymphozyten zu vermeiden, wurden daher die PDC mit CpG-ODN Typ B für 48 Stunden vorinkubiert und anschließend ein Medium-Wechsel vollzogen. In weiteren Messungen von IFN- α in den Überständen der Ko-Kulturen von PDCs und CD8+ T-Lymphozyten konnten keine erhöhten IFN- α Spiegel nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

CD8+ T-Lymphozyten benötigen für ihre Aktivierung ein köperfremdes Antigen, welches über den TCR erkannt wird. Liegt kein derartiger mikrobieller- oder viraler Stimulus vor, induzieren PDC regulatorische CD8+ T-Lymphozyten [Gilliet und Liu 2002]. Da die PDC im Gegensatz zur MDC kaum zur Phagozytose befähigt ist, kann sie auch keine exogenen Antigene präsentieren. Der einzige Fall, in dem eine Präsentation eines exogenen Antigens durch eine PDC beschrieben wurde, war die direkte Infektion der PDC durch einen Virus [Fonteneau et al. 2003]. Um dennoch eine mögliche Kostimulation der PDC zu überprüfen, wurde deshalb in dieser Arbeit ein, gegen den TCR gerichteter, Anti-CD3-Antikörper verwendet. Dieser wäre alleine nicht in der Lage in CD8+ T-Lymphozyten eine IFN- γ Sekretion zu induzieren. Somit muss die zu messende IFN- γ Sekretion durch CD8+ T-Lymphozyten entweder durch lösliche Faktoren, oder aber durch einen direkten Zell-zu-Zellkontakt mit der PDC hervorgerufen werden.

Überraschenderweise zeigte sich bereits, dass die alleinige Anwesenheit der PDC bei, mit CD3 Beads aktivierten, CD8+ T-Lymphozyten ausreichend ist, um eine leichte IFN- γ Sekretion auszulösen. Eine genauere Analyse der auf der PDC exprimierten Oberflächenproteine mittels eines Gen-Chips zeigte, dass bereits die unstimulierte PDC, wenn auch in deutlich geringerem Maße als die aktivierte PDC, kostimulatorische Moleküle z.B. der B-7 Familie trägt und somit für diese geringe Stimulation des CD8+ T-Lymphozyten

sorgen könnte. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine gemeinsame Stimulation des CD3 und des CD28 Rezeptors in naiven CD8+ T-Lymphozyten eine IFN- γ Sekretion auslöst [zusammengefasst in Janeway et al. 2002].

In der nun vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, dass eine, durch CpG-ODN Typ B stimulierte, PDC in der Lage ist in, durch ihren TCR voraktivierten, CD8+ T-Lymphozyten hohe Spiegel an IFN- γ zu induzieren.

Neben der Sekretion des IFN- γ sollte in einem weiteren Schritt überprüft werden, ob eine Kostimulation CD8+ T-Lymphozyten durch die zuvor mittels CpG-ODN stimulierten PDCs zu einer weiteren Steigerung der zytotoxischen Aktivität der CD8+ T-Lymphozyten führt.

Betts et al. konnte 2003 zeigen, dass es bei der Degranulation, einer notwendigen Grundvoraussetzung für die Zytotoxizität einer T-Zelle, zu einer Steigerung der Expression des Oberflächenmoleküls CD107a (LAMP-1) und CD107b (LAMP-2) auf der Effektorzelle kommt. Die *Lysosome Associated Membrane Proteins (LAMP)*, deren genaue Funktion innerhalb der Vakuolen bisher ungeklärt ist, werden vor allem in den Lumen von Vakuolen und lysosomalen Strukturen gefunden [Carlsson et al. 1993]. Betts et al. konnten des Weiteren zeigen, dass eine Steigerung der Expression der Oberflächenmoleküle CD107a/b an der Oberfläche von antigen-spezifischen CD8+ T-Lymphozyten direkt in Korrelation mit einer intrazellulären Abnahme der Spiegel von Perforinen und Granzymen, beides wichtige Bestandteile der zellulären Abwehr, steht. Somit ist eine Messung der Expression von CD107a/b an der Zelloberfläche direkt korreliert mit der zytotoxischen Aktivität der Zelle. In der nun vorliegenden Arbeit wird somit das erste Mal gezeigt, dass mittels CpG-ODN aktivierte PDCs in der Lage sind bei, über den TCR voraktivierten, naiven CD8+ T-Lymphozyten eine Antigen-unabhängige Steigerung der Zytotoxizität hervor zu rufen. Es sei hier vermerkt, dass ein klassischer Zytotoxizitäts-Assay aus technischen Gründen nicht möglich war. Da die Antigen-Spezifität der über CD3 stimulierten T-Zellen nicht bekannt ist, kann man in diesem Versuchsaufbau auch keine spezifischen Lyse-Tests durchführen. Da jedoch der CD107 Degranulationsassay in der Literatur weithin als hervorragendes Korrelat der Zytotoxizität einer T-Zelle angesehen wird, erschien uns dieses Verfahren hier als idealer Ersatz.

Ein weiterer Beweis für eine Steigerung der Zytotoxizität CD8+ T-Lymphozyten durch aktivierte PDCs sind die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen der Konzentration von Granzyme B in den Überständen von Ko-Kulturen beider Zellen (Abb. 7). Granzyme B gehört zu den Serin-Proteasen in zytolytischen Granula von zytotoxischen T-Lymphozyten sowie von NK- und NKT Zellen [Lobe et al. 1986] und stellt neben Perforinen einen der wichtigsten

Bestandteile der zellulären Abwehr dar [Russel und Ley. 2002]. Der Mechanismus beruht darauf, dass nach dem Binden an die Zielzelle die zytolytischen Granula in den Intrazellularraum sezerniert werden. Anders als früher angenommen, bindet das Granzyme B dort an hoch-affine Rezeptoren und wird in die Zelle durch Endozytose aufgenommen [Pinkoski et al. 1998]. In Kombination mit Perforinen kommt es dann zu einer Apoptose der Zielzelle.

Überraschender Weise zeigte sich bei einer intrazellulären Messung von Granzyme B zur genaueren Charakterisierung der Sekretion in den Zellen der Ko-Kultur, dass neben den CD8+ T-Lymphozyten auch die PDC in der Lage ist Granzyme B zu produzieren (Daten nicht gezeigt). Diese nun erstmals in-vitro bestätigte Beobachtung korreliert gut mit einem in der Literatur beschriebenen, mittels subtraktiver Hybridisierung gemachten, Fund von Transkripten für Granzyme B in der PDC, die nach einer entsprechenden Aktivierung der PDC aufreguliert wurden [Rissoan et al. 2002]. Des Weiteren wird in der Literatur beschrieben, dass in den Tumorzellen einer PDC-assoziierten Leukämie Granzyme B nachgewiesen werden kann [Chaperot et al. 2002, Gopcsa et al. 2005]. Somit könnten die in dieser Arbeit gemessenen Spiegel von Granzyme B in den Überständen auch durch eine zusätzliche Sekretion des Granzyme B durch die PDC mitbedingt sein. Eine Messung einer möglichen Zytotoxizität mittels der Expression von CD107a/b war sowohl aufgrund der kurzen Überlebenszeit, als auch der geringen Absolutzahl der PDCs, die von einem Spender isoliert werden konnten, im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Der Befund zeigt aber deutlich die Notwendigkeit einer weiteren Charakterisierung sowie die Aufklärung der Herkunft der PDC.

4.2.2. Mechanismen der Aktivierung von CD8+ T-Lymphozyten durch die PDC

a) Lösliche Faktoren

Aus diversen Arbeiten wie auch den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen ist bekannt, dass eine alleinige Stimulation CD8+ T-Lymphozyten über den TCR nicht ausreicht um eine IFN- γ Sekretion zu bewirken oder aber die Zytotoxizität (Expression von CD 107a/b) zu steigern (zusammengefasst in Janeway et al. 2002). Die Steigerung der Zytotoxizität, wie auch die INF- γ muss somit durch die PDC bedingt sein. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass eine Aktivierung von NKT-Zellen und peptidspezifischen CD8+ *memory* T-Lymphozyten sowohl durch lösliche Faktoren, wie auch einen direkten Zellkontakt der Effektorzelle mit der aktivierten PDC ausgelöst wird [Hornung et al. 2002, Marschner et al. 2005]. Die Blockierung

verschiedener für die T-Zell-Aktivierung in Frage kommender Zytokine mittels spezifischer Antikörper zeigt, dass in der vorliegenden Arbeit die Aktivierung des naiven CD8+ T-Lymphozyten nicht durch IL-12, IL-15, IL-18 und INF- α ausgelöst wird. Wie in Abschnitt 4.2.1. beschrieben, ist eine Vorinkubation der PDC notwendig, um eine Aktivierung des CD8+ T-Lymphozyten zu ermöglichen. Hierfür ist wahrscheinlich in erster Linie die antiproliferative Wirkung des IFN- α verantwortlich [Erickson et al. 1999], und evtl. auch eine maximale Ausreifung der PDC, wie sie erst nach prolongierter Inkubationszeit gesehen wird.

Bei der Aktivierung einer PDC durch ein CpG-ODN kommt es ja nach verwendetem CpG-ODN zur Expression bestimmter Oberflächenmoleküle. CpG-ODN-Typ B ist in der Lage eine PDC zu einer phänotypischen und funktionellen Ausreifung zu bringen [zusammengefasst in Rotheffusser et al. 2002]. Zu den daraufhin an der Oberfläche exprimierten Molekülen gehört auch das kostimulatorische Molekül CD40. Krug et al. konnten 2001 zeigen, dass es bei einer Aktivierung der PDC durch ein CpG-ODN in Gegenwart von CD40L zu einer Sekretion von IL-12 kommen, und somit die PDC eine IL-12 vermittelte TH1-Antwort auslösen kann. *CD40 Ligand (CD40L)* ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie und wird insbesondere an der Oberfläche von aktivierten T-Lymphozyten gefunden [zusammengefasst in Xu und Song 2004]. In der Literatur ist bekannt, dass IL-12 in der Lage ist in T-Lymphozyten hohe Mengen an IFN- γ zu induzieren [Manetti et al. 1994, Gerosa et al 1994]. Somit könnte diese von Krug et al. beschriebene IL-12 Sekretion eine IFN- γ Sekretion auslösen. Die Blockierung von IL-12 mittels eines spezifischen Antikörpers zeigt jedoch, dass der in dieser Arbeit beobachtete Effekt nicht durch IL-12 vermittelt wird.

Für IL-15 wird in der Literatur ein verstärkender Effekt einer IL-12-vermittelten IFN- γ Induktion beschrieben [Avice et al. 1998]. Da IL-15 des Weiteren in der Lage ist, auf die Expression des ko-stimulatorischen Moleküls CD40 auf einer APC und der Expression von CD40L auf Effektorzellen Einfluss zu nehmen, wäre ein zusätzlich verstärkender Effekt auf die IL-12 Sekretion denkbar. Da sich aber bereits im Vorfeld zeigte, dass der in dieser Arbeit beobachtete Effekt nicht durch IL-12 vermittelt ist, verwundert es nicht, dass auch die Blockierung von IL-15 mittels eines spezifischen Antikörpers keine Auswirkung auf die IFN- γ bewirkt.

In der Literatur wird die Wirkung von IL-18 bevorzugt in Kombination mit der Wirkung von IL-12 beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde IL-18 auch als *IFN- γ induzierender Faktor* (IGIF) bezeichnet. IL-18 ist in der Lage eine Sekretion von IFN- γ in TH1-Zellen, naiven T-Zellen und NK-Zellen zu vermitteln, wobei IL-12 eine synergistische Rolle einnimmt [Yoshimoto, Okamura et al. 1997, Okamura et al 1998, Yoshimoto, Takeda et al. 1998].

Entgegen der normalerweise notwendigen Aktivierung über den TCR ist jedoch bei dem, in der Literatur beschriebenen, synergistischen Effekt von IL-12 und IL-18 zur Induktion von IFN- γ eine TCR-vermittelte Aktivierung des T-Lymphozyten nicht erforderlich [Ahn, Maruo et al. 1997, Yoshimoto, Okamura et al 1997, Yoshimoto, Takeda et al. 1998, Tominaga, Yoshimoto et al 2000]. Dieser Effekt wird dadurch erklärt, dass IL-12 in der Lage ist bei z.B. naiven T-Lymphozyten aber auch bei NK-Zellen die Expression des IL-18 Rezeptors zu steigern. Die anschließende Ligation des IL-18 Rezeptors führt zu einer vermehrten Sekretion von IFN- γ [Kinikata, Torigoe et al. 1998, Tominaga, Yoshimoto et al 2000]. Außerdem wird in der Literatur beschrieben, dass IL-18 in der Lage ist die Expression des IL-12 Rezeptors zu steigern [Tomura, Maruo et al. 1998, Yoshimoto, Takeda et al. 1998, Chang et al. 2000]. In der Literatur ist eine IL-18 abhängige IFN- γ Sekretion durch NK-Zellen nach einer Virusinfektion beschrieben, die jedoch nicht notwendigerweise IL-12 als synergistische Ko-Stimulation benötigte [Barr et al 2007]. In diesem Kontext könnte der in dieser Arbeit beobachtete Effekt auf demselben Weg funktionieren. Die Blockierung von IL-18 mittels eines spezifischen Antikörpers zeigte jedoch auch hier, dass der beobachtete Effekt nicht von IL-18 abhängig ist, oder aber einen synergistischen Effekt auf eine mögliche IL-12-vermittelte IFN- γ Sekretion hat.

Es zeigt sich somit in der vorliegenden Arbeit, dass lösliche Faktoren zwar bei der Induktion einer IFN- γ Sekretion von peptidspezifischen- und *memory*-T-Lymphozyten sowie NKT Zellen eine Rolle spielen, jedoch bei einer Aktivierung naiver CD8+ T-Lymphozyten keine oder aber höchstens eine untergeordnete Rolle.

b) Zellkontakt-abhängige Faktoren

Die Beobachtungen aus den vorangegangenen Versuchen dieser Arbeit sowie aus der Literatur [Marschner et al 2004] weisen darauf hin, dass lösliche Faktoren eine eher untergeordnete Rolle bei der Aktivierung naiver CD8+ T-Lymphozyten spielen. Überstände aktiverter PDC enthalten hohe Mengen an IFN- α , so dass dieses eine antiproliferative Wirkung auf den naiven T-Lymphozyten ausübt [Erickson et al 1999, Hornung et al. 2002]. Außerdem zeigte sich für die Induktion einer IFN- γ Sekretion CpG-ODN Typ B, dass für eine Ausreifung (Expression der Oberflächenmoleküle CD80, CD83 und CD86, sowie CD40) [Krug et al. 2001] der PDCs sorgt, dem CpG-ODN Typ A deutlich überlegen. Zusätzlich ist für den, in dieser Arbeit beobachteten, Effekt eine Vorinkubation der PDC erforderlich (siehe Abschnitt 4.2.1), was zusätzlich eine Zytokin-vermittelte IFN- γ Sekretion eher unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Die CpG-vermittelte Steigerung der IFN- γ Sekretion ist demnach von einem anderen nicht löslichen von der PDC ausgehenden Aktivierungssignal abhängig.

Weiterhin zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Transwell-Untersuchungen, dass es zu einer fast vollständigen Aufhebung der IFN- γ Sekretion kommt, sobald die mittels CpG-ODN aktivierten PDCs von den CD8+ T-Lymphozyten räumlich getrennt werden (siehe Abb. 19). In der Literatur sind einige Oberflächenmoleküle beschrieben, die an einer Zellkontakt-vermittelten Interaktion zwischen normalen DCs und CD8+ T-Lymphozyten beteiligt sind oder beteiligt sein könnten. Insbesondere die B7 Rezeptorfamilie spielt für die IFN- γ Sekretion eine entscheidende Rolle. In Gegenwart von Gefahren-Signalen (wie z.B. LPS) kommt es zu einer Aktivierung „normaler“ DCs. Hierdurch kommt es zu einer funktionellen und phänotypischen Ausreifung der DCs (CD80, CD83, CD86 sowie CD40) sowie zur Sekretion bestimmter Zytokine wie z.B. IL-12. Diese Faktoren bewirken eine Stimulation von T-Lymphozyten, die ihrerseits hohe Mengen an IFN- γ sezernieren [zusammengefasst in Janeway et al. 1999]. Ähnlich einer myeloiden dendritischen Zelle kommt es auch bei einer PDC nach einer Aktivierung durch CpG-ODN Typ B zu einer funktionellen, wie auch phänotypischen Ausreifung der Zelle. Außerdem kommt es ebenfalls wie bei den myeloiden dendritischen Zellen zu einer verstärkten Expression der Oberflächenmoleküle CD80, CD83, CD86 und CD40 sowie von OX40L [zusammengefasst in Rotheffusser et al. 2002].

Der Einsatz eines blockierenden CD28 Antikörpers, der eine Interaktion über B7/CD28 unterbindet, zeigt in der vorliegenden Arbeit erstmals, dass es der, über CpG-ODN Typ B aktivierten, PDC möglich ist, über die ko-stimulatorischen Moleküle in naiven CD8+ T-Lymphozyten eine IFN- γ Sekretion zu induzieren. Es zeigte sich jedoch auch, dass diese Interaktion zwischen B7/CD28 nicht der alleinige Auslöser einer IFN- γ Sekretion darstellt (siehe Abb. 22).

Neben dem B7/CD28-Signalweg wird des Weiteren einer Wechselwirkung zwischen OX40 und seinem Liganden bei DCs und T-Lymphozyten wichtige regulatorische Funktionen zugeschrieben [Chen et al. 1999, Maxwell et al. 2000]. Ito et al konnten 2004 zeigen, dass es nach der Stimulation mit einem Virus zu einer Aufregulation des OX40 Liganden auf einer PDC kommt [Ito et al. 2004]. Somit könnte hierdurch ein weiterer ko-stimulatorischer Effekt bei einer Interaktion von PDCs mit CD8+ T-Lymphozyten erklärt werden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Blockade mit Anti-OX40 Antikörper in der Lage ist eine Reduktion des sezernierten IFN- γ zu bewirken. Diese Beobachtung einer ko-stimulatorischen Wirkung der Interaktion von OX40/OX40L auf aktivierten PDCs und CD8+ T-Lymphozyten deckt sich mit einer bei Mäusen gemachten Beobachtung einer OX40/OX40L abhängigen Induktion von IFN- γ in einem Tumormodell [Liu et al. 2008]. Allerdings ist es nicht möglich aus dem

murinen System direkt Rückschlüsse auf das humane System zu ziehen, da im murinen System auch myeloide dendritische Zellen in der Lage sind CpG-ODNs zu erkennen. Dennoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass zumindest ein zusätzlicher ko-stimulatorischer Effekt durch PDCs über eine Interaktion zwischen OX40 und OX40L bei naiven CD8+ T-Lymphozyten vermittelt wird.

Somit kann aus den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen gefolgert werden, dass es bei der Aktivierung von PDCs mittels CpG-ODN Typ B zu einer phänotypischen Ausreifung kommt, die konsekutiv unter Mitbeteiligung der B7 Rezeptorfamilie, wie auch einer Interaktion von OX40/OX40L, eine INF- γ Sekretion in CD8+ T-Lymphozyten mitinduzieren kann. Auf der anderen Seite zeigen die Ergebnissen dieser Arbeit jedoch auch, dass es in der Interaktion von PDCs mit naiven CD8+ T-Lymphozyten mindestens einen weiteren Mechanismus geben muss, der für die Induktion einer IFN- γ Sekretion verantwortlich ist, da sich bei einer synchronen Blockade der B7 Rezeptorfamilie, sowie von OX40/OX40L, immer noch, wenngleich auch vermindert, eine IFN- γ Sekretion nachweisen lässt (siehe Abb. 21)

Für T-Lymphozyten ist beschrieben, dass diese, sobald sie ihr spezifisches Antigen in Assoziation mit MHC Molekülen präsentiert bekommen, den Rezeptor CD40L aufregulieren. Die Interaktion von T-Lymphozyten mit DCs mittels CD40/CD40L ist relativ gut untersucht. Die Ligation von CD40 auf der Antigen-präsentierenden DC ist in der Lage hohe Spiegel von IL-12 zu induzieren, die Proliferation von CD8+ T-Lymphozyten zu verstärken und NK-Zellen zu aktivieren [zusammengefasst in O'Sullivan und Thomas 2003].

Somit leisten die aktivierte T-Lymphozyten eine „T-Zell-Hilfe“ indem sie die Ausreifung von MDCs und deren Fähigkeit zum „Priming“ verstärken.

Krug et al. konnten 2001 zeigen, dass es bei PDCs nach deren Aktivierung, insbesondere durch CpG-ODN Typ B, zu einer verstärkten Expression von CD40 auf der Zelloberfläche der PDC und es zusätzlich durch eine Ligation von CD40L zu einer Stimulation der Sekretion von IFN- α sowie IL-12 kommt [Krug, 2001]. Eine Interaktion von T-Lymphozyten könnte somit nicht nur zwischen MDCs und T-Lymphozyten erfolgen, sondern auch zwischen T-Lymphozyten und PDCs. Außerdem könnte es über lösliche Faktoren zu einer Ko-Stimulation von PDCs und MDCs kommen.

In der Literatur wird weiterhin beschrieben, dass aktivierte CD8+ T-Lymphozyten, nach ihrer Aktivierung die Expression von CD28 an ihrer Oberfläche herunterregulieren. Die Abnahme von CD28 in der T-Zelle ist jedoch negativ korreliert mit der Aufregulierung von NK Rezeptoren [Bauer et al. 1999, Speiser et al. 1999, Groh et al. 2001, Kambayashi et al. 2000]. Ein Teil der Ko-Stimulation über CD28 scheint daher bei aktivierte CD8+

T-Lymphozyten durch NK-Rezeptoren übernommen zu werden [Speider et al. 1999]. Besondere Bedeutung wird hierbei dem NK-Rezeptor NKG2D zugeschrieben. Dieser wirkt als aktivierender Rezeptor für das *MHC class I like Molecule MICA (MHC class I chain related A)*. Vivier et all beschrieben 2002 weitere Rezeptoren für NKG2D (MICB und ULBP 1-4). [Bauer et al. 1999, Wu et al. 1999, Cosman et al. 2001, Groh et al 2001]. Die Expression dieser MHC-kodierten MIC-Moleküle wird durch Zellstress oder auch genotoxischem Stress sowie viralen und bakteriellen Infektionen induziert und ist mit einer malignen Transformation assoziiert [Groh et al 1998, Groh et al. 2001, Raulet 2003, Gasser et al. 2005, Burgess et al. 2008]. Für NK Zellen ist beschrieben, dass eine Ligation von NKG2D insbesondere deren zytotoxische Aktivität, aber auch die Zytokin-Produktion verstärkt [Wu et al. 2000, Pende et al 2001, Ho et al. 2002]. Ähnliche Beobachtungen lassen sich jedoch auch für den CD8+ T-Lymphozyten machen [Bauer et al. 1999, Speiser et al. 1999, Groh et al. 2001, Kambayashi et al. 2000].

Interessanter Weise ist die PDC in der Lage durch die Produktion von IFN- α die Expression von MICA und MICB auf dendritischen Zellen zu steigern [Jinushi et al. 2003]. Durch die IFN- α Sekretion der PDCs könnte es also sowohl zu einer zusätzlichen Ko-Stimulation der Antigen-präsentierenden DCs, wie auch einer Ko-Stimulation CD8+ T-Lymphozyten über NK Zell-Rezeptoren kommen, die, die in dieser Arbeit gemachten, Beobachtungen erklären könnten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Transwell-Versuche haben jedoch das Problem, dass Sie nur in begrenztem Maße in der Lage sind *in-vivo* Bedingungen nachzustellen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich somit zwei Schlüsse ziehen:

- I.) Die aktivierenden oder ko-stimulatorischen Einflüsse werden über einen direkten Zellkontakt über bestimmte Oberflächenmoleküle wie z.B. die B7 Rezeptorfamilie und eine OX40/OX40L Interaktion vermittelt.
- II.) Für die Effektorzell-Aktivierung sind extrem hohe Zytokinkonzentrationen verantwortlich, die nur in unmittelbarer Nähe der sekretierenden Zelle erreicht werden. Außerdem ist z.B. für bestimmte Zytokine wie das TNF- α eine Bindung an die Zelloberfläche denkbar.

Die in dieser Arbeit durchgeführte spezifische Blockierung von Oberflächenmolekülen mittels bestimmter, hoch-spezifischer Antikörper zeigt jedoch eine funktionelle Bestätigung der Transwell-Experimente.

4.2.3. Der Unterschied in der Aktivierung CD8+ T-Lymphozyten im Hinblick auf die aktivierende Zelle.

Aus der Literatur ist bekannt, dass *myeloide dendritische Zellen (MDC)* in der Lage sind in T-Lymphozyten sowohl Zytokine zu induzieren, wie auch deren Zytotoxizität zu erhöhen [zusammengefasst in Janeway et al. 2002]. Hierzu ist neben einer Antigen-Präsentation über MHC-Moleküle eine zusätzliche Ko-Stimulation z.B. über die B7-Rezeptorfamilie erforderlich. Ohne eine zusätzliche Ko-Stimulation des T-Lymphozyten kommt es nach dessen Aktivierung über den TCR entweder zu einer Apoptose oder aber einer Anergie.

Bei MDCs kommt es nach deren Aktivierung durch das für sie spezifische Antigen LPS zu einer funktionellen, wie auch phänotypischen Ausreifung (Aufregulierung von CD80, CD83 und CD86 sowie CD40).

In der nun vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine, mittels CpG-ODN Typ B aktivierte, PDC in der Lage ist, in einem über den TCR aktivierten CD8+ T-Lymphozyten Granzyme B zu induzieren. Bei Granzyme B handelt es sich um einen für die zytotoxische Aktivität von T-Lymphozyten essentiellen Faktor. Die eigentlich zytotoxische Wirkung der Granzyme ist aktuell im Fokus der wissenschaftlichen Forschung, über die eigentliche Induktion von z.B. Granzyme B ist aber noch relativ wenig bekannt.

Außerdem zeigt die vorliegende Arbeit, dass aktivierte PDCs in der Lage sind in, über TCR aktivierte, CD8+ T-Lymphozyten höhere Mengen an IFN- γ zu induzieren als dies, über LPS aktivierte, MDCs vermögen. In Zusammenschau mit den in dieser Arbeit mittels blockierender Antikörper gemachten Beobachtungen, die eine CD28-Abhängigkeit sowie eine OX40/OXL der Ko-Stimulation von T-Lymphozyten durch die aktivierte PDC zeigten, ergibt sich somit die Notwendigkeit eines zusätzlichen kontaktabhängigen Faktors bei der Aktivierung von CD8+ T-Lymphozyten durch PDCs. Sowohl OX40 als auch die Liganden von CD28 werden auf MDCs nach deren Aktivierung exprimiert. Somit wäre eine ähnliche Aktivierung CD8+ T-Lymphozyten wie durch PDCs über dieselben Mechanismen auch bei MDCs denkbar. Ein Unterschied in der Sekretion des IFN- γ wie auch des Granzyme B und die Steigerung der Zytotoxizität lässt sich jedoch hierdurch nicht erklären.

Die gemachten Beobachtungen zeigen also die Notwendigkeit einer weiteren Charakterisierung der PDC sowie einer weiteren Untersuchung möglicher Zellkontakt-abhängiger Faktoren.

4.2.4. Modell einer Kostimulation CD8+ T-Lymphozyten durch über CpG-ODN aktivierte PDCs

Fasst man die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen zusammen, könnte sich eine Stimulation naiver CD8+ T-Lymphozyten folgendermaßen abspielen. Nach einer Aktivierung der PDCs durch virale oder mikrobielle Stimuli kommt es am Ort der Aktivierung zur Induktion und Sekretion von hohen Mengen IFN- α . Außerdem kommt es zu einer phänotypischen Ausreifung der PDC. Diese exprimieren daraufhin neben den Oberflächenmolekülen CD80, CD86 und CD83, die als Liganden der B7 Rezeptorfamilie auf Lymphozyten wirken, auch CD40. In Assoziation mit den am Ort der Aktivierung bereits vorhandenen voraktivierten- und peptidspezifischen T-Lymphozyten, die CD40L exprimieren, kommt es zu einer potenteren Induktion von IL-12 und damit zu einer Sekretion von IFN- γ . Die PDC aktiviert somit am Ort der Aktivierung durch einen viralen oder bakteriellen Stimulus die vorhandenen, voraktivierten und peptidspezifischen T-Lymphozyten, NK- sowie NKT-Zellen [Rotheffusser et al. 2002, Marschner et al. 2005] und ist dort in der Lage eine starke TH1-Antwort zu erzeugen.

Des Weiteren fördert das von der PDC sezernierte IFN- α die Aktivität und die Ausreifung von MDCs. Während der oben beschriebenen phänotypischen Ausreifung der PDC kommt es außerdem zur Expression des Chemokin-Rezeptors CCR7, der eine Wanderung der PDC in die T-Zone des Lymphknotens steuert. Im Lymphknoten treffen dann zeitgleich aktivierte MDCs, die vom Ort der Aktivierung ebenfalls in den Lymphknoten gewandert sind, auf naive T-Lymphozyten. Diese erkennen die ihnen präsentierten Antigene und expandieren daraufhin selektiv (Priming). Die mittels DNA, die ein CpG-Motiv enthält, aktivierten PDCs verstärken oder induzieren daraufhin über einen Zell-zu-Zell Kontakt Antigen-unabhängig die Proliferation und die Zytotoxizität der naiven oder der, gerade durch die MDC frisch aktivierten, CD8+ T-Lymphozyten.

In diesem Modell kommt der PDC also die Rolle zu, die Antigen-spezifische Immunantwort von antigen-spezifischen oder Memory T-Lymphozyten, aber auch naiven oder gerade geprimten T-Lymphozyten zu verstärken, oder Ihre Differenzierung in Richtung einer TH-1 Effektorzelle zu lenken. Somit legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe, dass die im Immunsystem vorkommenden DCs je nach dem zeitlichen Abstand ihrer Aktivierung, bestimmte Aufgaben bei der Differenzierung und dem Priming naiver-, wie auch peptidspezifischer- oder *memory* T-Lymphozyten übernehmen können.

4.3. Ausblick

PDCs spielen bei der Entstehung autoimmunologischer Erkrankungen eine wichtige Rolle. Hier steht besonders ihre Bedeutung als Hauptproduzent von IFN- α im Fokus aktueller Untersuchungen. Es wurde gezeigt, dass bei Patienten mit einem *Lupus erythematoses* (LE) Komplexe aus anti-DNA Antikörpern und DNA in der Lage sind, diese zu aktivieren und somit große Mengen von IFN- α in PDCs zu induzieren. Hierbei schützt die Bindung an die Antikörper im Plasma die DNA offensichtlich vor ihrem Abbau durch Nukleasen, so dass bei diesen Patienten ein konstant erhöhter IFN- α Spiegel im Blut nachgewiesen werden kann. Interessant ist jedoch auch, dass während sich im peripheren Blut bei LE Patienten eine verringerte Anzahl von PDCs zeigt [Blanco et al., 2001] diese massiv die, durch den LE betroffenen, Hautareale infiltrieren [Farkas et al. 2001]. Hierbei zeigt sich bei den in der Junktionszohne der Epidermis vorkommenden PDCs eine starke Assoziation mit zytotoxischen T-Lymphozyten, die dort durch IFN- α -induzierbare Chemokine rekrutiert werden [Blomberg et al. 2001; Farkas et al. 2001; Wenzel et al. 2005]. Diese zytotoxischen T-Lymphozyten werden durch die Sekretion von Perforinen und Granzyme B als Hauptverursacher für die Hautläsionen, die beim Lupus erythematoses beobachtet werden können, angesehen [Blanko et al. 2005]. Aktuell werden erste Phase 2 Studien mit einem IFN- α blockierenden Antikörper (MEDI-545) durchgeführt. Die Ergebnisse der Phase 1 Studien hatten gezeigt, dass es durch eine Blockierung von IFN- α zu einer Besserung des Lupus erythematoses gekommen war. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen jedoch nahe, dass es neben dem Einfluss einer IFN- α Sekretion durch PDCs auch noch einen direkten Zellvermittelten weiteren Effektweg geben könnte, der für die Entstehung des Lupus erythematoses verantwortlich sein könnte. Über eine Zellkontakt-vermittelte Pathogenese bei einem Lupus erythematoses, im Hinblick auf PDCs und zytotoxische T-Zellen, ist jedoch aktuell relativ wenig bekannt, so dass sich hier aktuell die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zeigt

Dies ist insbesondere interessant, da neben dem LE ähnliche Beobachtungen auch bei anderen Hauterkrankungen wie der Psoriasis, dem allergischen Kontaktekzem oder auch der Dermatomyositis gemacht werden konnten [Wollenberg et al. 2002, Nestle et al. 2005; Greenberg et al. 2005, Santoro et al. 2005; Parolini et al. 2007; Albanesi et al. 2009; Skrzeczynska-Moncznik et al. 2009]. Es konnte sich auch hier eine PDC-Zellkontakt-vermittelte Pathogenese zeigen, so dass hier z.B. TLR9 blockierende Antikörper in der Zukunft eine wichtige Rolle in den Behandlungskonzepten dieser Krankheiten spielen könnte.

Eine weitere Aufklärung der Mechanismen zur Aktivierung der PDCs und deren Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems könnte daher zu einem besseren Verständnis der Pathomechanismen dieser, wie auch anderer Autoimmunerkrankungen führen.

Des Weiteren sind CpG-ODNs, durch ihre Fähigkeit direkt eine Immunantwort zu initiieren oder zu modulieren, ein attraktives Adjuvans bei einem möglichen therapeutischen Ansatz bei Tumorerkrankungen. Auf der einen Seite besitzen viele, die durch die PDC-induzierten, Zytokine, wie TNF- α , IL-12 oder IFN- α , eine direkte antitumorale Aktivität [Heaton et al. 1993, Kirkwood 2002]. Auf der anderen Seite sind viele der, durch die PDC aktivierte, Immunzellen wie NK-Zellen, peptidspezifische und *memory* T-Lymphozyten bei der zellulären Abwehr von entscheidender Bedeutung [Rotenfusser et al 2003, Marschner et. 2004].

Mayordomo et al. konnten 1995 zeigen, dass mit Tumor-Lysat gepulste DCs in der Lage waren eine Regression von Melanom-Metastasen im Menschen zu erzielen. Es zeigte sich jedoch, dass nur eine geringe Menge der Probanden auf diesen Therapieansatz ansprachen, wohingegen dieser im murinen System ein kuratives Potential besaß. Durch eine Kombination von CpG-ODNs und Tumor-Antigenen konnte die Ansprechraten jedoch auch im murinen System deutlich verbessert werden [Shirota et al. 2000, Cho et al. 2000]. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei der Kombination von CpG-ODNs mit bestimmten therapeutischen Antikörpern (Rituximab beim folliculären Lymphom oder die Anwendung von 17-1A bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms) gemacht werden. Als Ursache hierfür wurde die zusätzlich Stimulation von Effektorzellen durch PDCs vermutet.

Kürzlich konnte im murinen System gezeigt werden, dass die peritumorale Behandlung eines Melanoms mit CpG-ODN 2006 (in der Literatur auch beschrieben als PF-3512676 und CPG 7909 sowie unter dem Handelsnamen ProMune oder VaxImmune) sowohl das Wachstum des Primärtumors eindämmen und somit die untersuchten Tiere vor der Bildung pulmonaler Metastasen schützte konnte [Kunikata et al. 2004, Kim et al. 2009]. Diese Beobachtungen sind jedoch aufgrund der unterschiedlichen Expression des TLR9 im murinen- und im humanen System nicht direkt auf den Menschen übertragbar, so dass im Moment erste Phase I und II Versuche beim Menschen bezüglich diverser Tumoren durchgeführt werden.

In diesen ersten klinischen Tests mit CpG-ODN als alleiniges Agents zeigten sich jedoch aktuell weniger beeindruckende Ergebnisse als die vorklinischen Versuche zu hoffen veranlasst hatten. Dennoch zeigten sich bei anderen Tumoren Anzeichen für eine antitumorale Wirkung in Patienten mit einem Glioblastom [Carpentier et al. 2006] sowie vorbehandelten Non-Hodgkin Lymphom [Link et al. 2006].

Präklinische Tierversuche legen daher die Vermutung nahe, dass sich CpG-ODNs besser als weitere Komponente in einer multimodalen Therapie von Tumoren eignen könnten, als alleinige Agents in einer Monotherapie. CpG-ODN konnte, wie im Tiermodel bereits erfolgt, kombiniert werden mit

- i) monoklonalen Antikörpern
- ii) einer Chemotherapie
- iii) einer Radiatio
- iv) anderen immunstimulatorischen Substanzen wie Zytokinen oder
- v) zusammen mit Antigen in Form einer Vakzinierung.

In allen diesen Bereichen laufen im Moment erste klinische Studien, es ist jedoch zum aktuellen Zeitpunkt noch zu früh über deren Ausgang Aussagen zu machen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen jedoch noch einen weiteren therapeutischen Ansatz möglich. Durch eine ex vivo Stimulation mit CpG-ODNs könnten PDCs so stimuliert werden, dass sie nach z.b. peri- oder intraläsional Einbringen dort eine unspezifische zytotoxische T-Zell Antwort auslösen und damit eine antitumorale Antwort auslösen könnten.

5. Zusammenfassung

1999 wurde erstmals die plasmazytoide dendritische Zelle (PDC) charakterisiert, die im Immunsystem auf die Erkennung von Viren spezialisiert ist. Die PDC ist verantwortlich für einen großen Teil der Typ-I Interferonproduktion bei einer Virusinfektion. Sie unterscheidet sich jedoch grundlegend von anderen im Immunsystem vorkommenden DCs, da sie kaum zur Phagozytose befähigt, und somit, im Gegensatz zu anderen DCs, nicht in der Lage ist Fremd-Antigen zu präsentieren. Die PDC ist, anders als im murinen System, neben der B-Zelle im humanen System die einzige Zelle, die über TLR9 stimuliert werden kann. TLR9 erkennt hierbei spezifische Motive in mikrobieller DNA (bakteriell oder viral). Diese Motive mikrobieller DNA zeichnen sich durch eine spezifische Wiederholung der Aminosäuren Cytosin und Guanosin, sogenannte CpG-Motive, aus. Bisher wurden im humanen System drei CpG-Motive enthaltende Oligonukleotid-Klassen beschrieben (CpG-ODN-Typ A-C). CpG-ODN Typ A zeichnet sich durch eine starke Induktion von Typ-I-Interferon aus, während CpG-ODN Typ B geringere Mengen IFN- α induziert, jedoch zu einer funktionellen Ausreifung der PDC führt. Diese CpG-Motive werden über den TLR9 Rezeptor erkannt, der, anders als im murinen System, im humanen System einzig von PDCs exprimiert wird. Aktivierte PDCs sind in der Lage in peptidspezifischen- oder *memory* T-Lymphozyten, wie auch NK- und NKT-Zellen mittels löslicher und zellkontaktabhängiger Faktoren eine TH1-Antwort auszulösen beziehungsweise zu verstärken. In der Literatur zeigte sich jedoch bisher ein hemmender Einfluss auf naive T-Lymphozyten. Dies warf die Frage auf, ob aktivierte PDCs auch in der Lage sind bei naiven T-Lymphozyten eine Immunantwort zu induzieren oder diese zu modulieren. In einem zweiten Teil sollten dann die zugrunde liegenden Mechanismen untersucht werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher versucht eine mögliche Ko-Stimulation naiver CD8+ T-Lymphozyten durch PDCs in Abhängigkeit ihrer Aktivierung zu untersuchen. Es zeigte sich, dass sowohl naive, wenngleich auch in deutlich geringerem Maße, als auch mittels CpG-ODN aktivierte PDCs in der Lage sind in naiven CD8+ T-Lymphozyten eine starke IFN- γ Induktion auszulösen, sowie deren Zytotoxizität zu steigern. Da die PDC in diesem System keine Antigene präsentieren kann, muss diese Ko-Stimulation Antigen-unabhängig erfolgen. Außerdem zeigte sich, dass das, für eine funktionelle und phänotypische Ausreifung der PDC verantwortliche, CpG-ODN Typ B dem, stark IFN- α induzierenden, CpG-ODN Typ A deutlich überlegen ist. Als mögliche Ursache wurde ein bereits bekannter und in der Literatur mehrfach beschriebener antiproliferativer Effekt von IFN- α auf naive

T-Lymphozyten vermutet. Da jedoch auch CpG-ODN Typ B in der Lage ist, wenn auch in deutlich geringerem Maße als Typ A, in PDCs IFN- α zu induzieren, zeigte sich die Notwendigkeit einer Vorinkubation der PDC.

Versuche mit spezifischen blockierenden Antikörpern, die gegen IL-12, IL-15, IL-18 und IFN- α gerichtet sind, sowie Transwell-Experimente zeigten, dass die beobachteten Effekte, anders als bei peptidspezifischen- und *memory* T-Lymphozyten sowie NK- und NKT-Zellen, nicht durch lösliche Faktoren ausgelöst werden, sondern ein Zell-zu-Zell-Kontakt eine notwendige Voraussetzung für die Aktivierung naiver CD8+ T-Lymphozyten darstellt. Weitere Untersuchungen mit Antikörpern, die spezifisch eine kontaktabhängige Interaktion der B7 Rezeptorfamilie mit ihrem Ligand CD28 und eine Wechselwirkung von OX40/OX40L verhinderten zeigten, dass diese Oberflächenmoleküle an der Ko-Stimulation CD8+ T-Lymphozyten beteiligt sind, es jedoch zusätzlich mindestens einen weiteren Zellkontakt-abhängigen Mechanismus geben muss.

Es zeigte sich somit, dass wie bereits in früheren Arbeiten postuliert, die Bezeichnung der PDC als TH2-induzierender DC2 (im Gegensatz zu der TH1-induzierenden myeloiden dendritischen Zelle, DC1) nicht länger aufrecht erhalten werden kann.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit folgte daraufhin ein funktioneller Vergleich der myeloiden dendritischen Zelle (MDC) mit der plasmazytoiden dendritischen Zelle (PDC). Hierbei zeigte sich, dass die PDC der MDC in der Induktion einer TH1-Antwort und einer Steigerung der Zytotoxizität nicht nur ebenbürtig, sondern dieser sogar überlegen ist. So sind aktivierte PDCs in der Lage in, über den TCR, voraktivierten CD8+ T-Lymphozyten Granzyme B, einen für die Zytotoxizität essentiellen Stoff, zu induzieren, während aktivierte MDCs hierzu nicht oder nur in sehr geringem Maße in der Lage waren. Da jedoch auch MDCs auf ihren spezifischen Stimulus (LPS) mit einer Aufregulation der Rezeptoren CD80, CD83, CD86, CD40 sowie OX40 reagiert, muss auch dieser Effekt über einen zusätzlichen, bisher unentdeckten Mechanismus vermittelt werden.

Somit lässt sich ein Modell entwerfen, in dem die PDC an ihrem Aktivierungsraum in Peptidspezifischen- und *memory*-T-Lymphozyten sowie NK- und NKT-Zellen eine sofortige, starke Immunantwort über die Ko-Stimulation und Sekretion von Zytokinen hervorruft und konsekutiv in die T-Zell-Region des loko-regionären Lymphknoten wandert. Dort sind PDCs dann in der Lage eine, durch APCs eingeleitete, Immunantwort mittels Zell-zu-Zell Kontakt zu modulieren.

Die vorliegende Arbeit zeigte somit, dass die PDC eine zentrale, positiv regulatorische Rolle während einer Immunantwort einnimmt. Auf der anderen Seite offenbart sie jedoch auch das

bisher eingeschränkte Wissen über die Interaktion der PDC mit anderen Zellen des Immunsystems, so dass vor etwaigen klinischen oder therapeutischen Einsätzen die Notwendigkeit einer weiteren Charakterisierung besteht.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Agarwal, S. and Rao, A. (1998). "Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation." *Immunity* **9**(6): 765-75.
- Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M. and Wagner, H. (2002). "Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments." *Eur J Immunol* **32**(7): 1958-68.
- Ahn, H. J., Maruo, S., Tomura, M., Mu, J., Hamaoka, T., Nakanishi, K., Clark, S., Kurimoto, M., Okamura, H. and Fujiwara, H. (1997). "A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma." *J Immunol* **159**(5):2125-31.
- Akira, S. and Takeda, K. (2004). "Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol* **4**(7):499-511.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." *Nature* **413**(6857): 732-8.
- Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J. and Davis, M. M. (1996). "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes." *Science* **274**(5284): 94-6.
- Anderson, K. V. (2000). "Toll signaling pathways in the innate immune response." *Curr Opin Immunol* **12**: 13-9.
- Avice, M. N., Demeure, C. E., Delespesse, G., Rubio, M., Armant, M. and Sarfati M. (1998). "IL-15 promotes IL-12 production by human monocytes via T cell-dependent contact and may contribute to IL-12-mediated IFN-gamma secretion by CD4+ T cells in the absence of TCR ligation." *J Immunol* **161**(7):3408-15.
- Avrameas, S. and Builbert, B. (1971). "Enzymo-immunological determination of proteins with the aid of immunoabsorbants and enzyme-labelled antigens." *C R Acad Sci Hebd Séances Acad Sci D.*, **273**(25):2705-7.
- Azuma, M., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. (1993). "CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties." *J Immunol* **150**(4): 1147-59.
- Ballas, Z. K., Krieg, A. M., Warren, T., Rasmussen, W., Davis, H. L., Waldschmidt, M. and Weiner, G. J. (2001). "Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs." *J Immunol* **167**(9): 4878-86.
- Ballas, Z. K., Rasmussen, W. L. and Krieg, A. M. (1996). "Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA." *J Immunol* **157**(5): 1840-5.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. and Palucka, K. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Barr, D. P., Belz, G. T., Reading, P. C., Wojtasik, M., Whitney, P. G., Heath, W. R., Carbone, F. R. and Brooks, A. G. (2007). "A role for plasmacytoid dendritic cells in the rapid IL-18-dependent activation of NK cells following HSV-1 infection." *Eur J Immunol* **37**(5):1334-42.
- Barton, G. M. and Medzhitov, R. (2002a). "Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors." *Curr Opin Immunol* **14**(3): 380-3.
- Barton, G. M. and Medzhitov, R. (2002b). "Toll-like receptors and their ligands." *Curr Top Microbiol Immunol* **270**: 81-92.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L. and Spies T. (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." *Science* **285**(5428):727-9.
- Bauer, M., Redecke, V., Ellwart, J. W., Scherer, B., Kremer, J. P., Wagner, H. and Lipford, G. B. (2001a). "Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells." *J Immunol* **166**(8): 5000-7.

- Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. and Lipford, G. B. (2001b). "Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **24**: 24.
- Belvin, M. P. and Anderson, K. V. (1996). "A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway." *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 393-416.
- Bendigs, S., Salzer, U., Lipford, G. B., Wagner, H. and Heeg, K. (1999). "CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells." *Eur J Immunol* **29**(4): 1209-18.
- Bernasconi, N. L., Onai, N. and Lanzavecchia, A. (2003). "A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells." *Blood* **101**(11): 4500-4.
- Betts, M. R. and Koup, R. A. (2002). "Detection of T-cell degranulation: CD107a and b." *Methods Cell Biol* **75**:497-512.
- Billiau, A. (1996). "Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis." *Adv Immunol* **62**: 61-130.
- Biron, C. A. (2001). "Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look." *Immunity* **14**(6): 661-4.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. and Salazar-Mather, T. P. (1999). "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." *Annu Rev Immunol* **17**: 189-220.
- Bjorck, P. (2001). "Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice." *Blood* **98**(13): 3520-6.
- Bogdan, C. (2000). "The function of type I interferons in antimicrobial immunity." *Curr Opin Immunol* **12**(4): 419-24.
- Bohle, B., Jahn-Schmid, B., Maurer, D., Kraft, D. and Ebner, C. (1999). "Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and IFN-gamma production in cells from allergic individuals and inhibit IgE synthesis in vitro." *Eur J Immunol* **29**(7): 2344-53.
- Bohle, B., Orel, L., Kraft, D. and Ebner, C. (2001). "Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce low levels of TNF- alpha in human B lymphocytes: possible adjuvants for Th1 responses." *J Immunol* **166**(6): 3743-8.
- Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y. J. and O'Garra, A. (2003). "Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation." *J Exp Med* **197**(1): 101-9.
- Borthwick, N. J., Lowdell, M., Salmon, M. and Akbar, A. N. (2000). "Loss of CD28 expression on CD8(+) T cells is induced by IL-2 receptor gamma chain signalling cytokines and type I IFN, and increases susceptibility to activation-induced apoptosis." *Int Immunol* **12**(7): 1005-13.
- Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N. and Mantovani, A. (2003). "The Toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells." *Blood*.
- Brunner, C., Seiderer, J., Schlamp, A., Bidlingmaier, M., Eigler, A., Haimerl, W., Lehr, H. A., Krieg, A. M., Hartmann, G. and Endres, S. (2000). "Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate- guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti- tumor immune responses in vivo." *J Immunol* **165**(11): 6278-86.
- Burgess, S. J., Maasho, K., Masilamani, M., Narayanan, S., Borrego, F. and Coligan, J. E. (2008). "The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications." *Immunol Res* **40**(1):18-34.

- Byrnes, A. A., Ma, X., Cuomo, P., Park, K., Wahl, L., Wolf, S. F., Zhou, H., Trinchieri, G. and Karp, C. L. (2001). "Type I interferons and IL-12: convergence and cross-regulation among mediators of cellular immunity." *Eur J Immunol* **31**(7): 2026-34.
- Caramalho, I., Lopes-Carvalho, T., Ostler, D., Zelenay, S., Haury, M. and Demengeot, J. (2003). "Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide." *J Exp Med* **197**(4): 403-11.
- Carding, S. R. and Egan, P. J. (2002). "Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity." *Nat Rev Immunol* **2**(5): 336-45.
- Carlsson, S. R., Lycksell, P. O. and Fukuda, M. (1993) " Assignment of O-glycan attachment sites to the hinge-like regions of human lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2." *Arch Biochem Biophys* **304**(1):65-73.
- Carpentier, A. F., Chen, L., Maltonti, F. and Delattre, J. Y. (1999). "Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice." *Cancer Res* **59**(21): 5429-32.
- Carpentier, A. F., Xie, J., Mokhtari, K. and Delattre, J. Y. (2000). "Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs." *Clin Cancer Res* **6**(6): 2469-73.
- Carpentier, A., Metellus, P., Ursu, R., Zohar, S., Lafitte, F., Barrié, M., Meng, Y., Richard, M., Parizot, C., Laigle-Donadey, F., Gorochov, G., Psimaras, D., Sanson, M., Tibi, A., Chinot, O. and Carpentier A. F. (2006). "Intracerebral administration of CpG oligonucleotide for patients with recurrent glioblastoma: a phase II study." *Neuro Oncol* **2010 Apr;12**(4):401-8.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A. and Banchereau, J. (1997). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis." *Blood* **90**(4): 1458-70.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A. and Colonna, M. (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." *Nat Med* **5**(8): 919-23.
- Chang, J. T., Segal, B. M., Nakanishi, K., Okamura, H. and Shevach, E. M. (2000). " The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit." *Eur J Immunol* **30**(4):1113-9.
- Chaperot, L., Manches, O., Mi, J.Q., Moine, A., Jacob, M. C., Gressin, R., Molens, J. P., Sotto, J. J., Leroux, D., Bensa, J. C., and Plumas, J. (2002). " Differentiation of anti-tumour cytotoxic T lymphocytes from autologous peripheral blood lymphocytes in non-Hodgkin's lymphomas." *Br J Haematol* **119**(2):425-31.
- Chehimi, J., Starr, S. E., Kawashima, H., Miller, D. S., Trinchieri, G., Perussia, B. and Bandyopadhyay, S. (1989). "Dendritic cells and IFN-alpha-producing cells are two functionally distinct non-B, non-monocytic HLA-DR+ cell subsets in human peripheral blood." *Immunology* **68**(4): 488-90.
- Chelvarajan, R. L., Raithatha, R., Venkataraman, C., Kaul, R., Han, S. S., Robertson, D. A. and Bondada, S. (1999). "CpG oligodeoxynucleotides overcome the unresponsiveness of neonatal B cells to stimulation with the thymus-independent stimuli anti-IgM and TNP-Ficoll." *Eur J Immunol* **29**(9): 2808-18.
- Chien, Y. H., Iwashima, M., Kaplan, K. B., Elliott, J. F. and Davis, M. M. (1987). "A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation." *Nature* **327**(6124): 677-82.
- Cho, H. J., Takabayashi, K., Cheng, P. M., Nguyen, M. D., Corr, M., Tuck, S. and Raz, E. (2000). "Immunostimulatory DNA-based vaccines induce cytotoxic lymphocyte activity by a T-helper cell-independent mechanism." *Nat Biotechnol* **18**(5):509-14.

- Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V. and Harding, C. V. (1997). "CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity." *J Exp Med* **186**(10): 1623-31.
- Chuang, T. and Ulevitch, R. J. (2001). "Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells." *Biochim Biophys Acta* **1518**(1-2): 157-61.
- Cocks, B. G., Chang, C. C., Carballido, J. M., Yssel, H., de Vries, J. E. and Aversa, G. (1995). "A novel receptor involved in T-cell activation." *Nature* **376**(6537): 260-3.
- Coley, W. B. (1991). "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893." *Clin Orthop*(262): 3-11.
- Cousens, L. P., Peterson, R., Hsu, S., Dorner, A., Altman, J. D., Ahmed, R. and Biron, C. A. (1999). "Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection." *J Exp Med* **189**(8): 1315-28.
- Cowdery, J. S., Chace, J. H., Yi, A. K. and Krieg, A. M. (1996). "Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides." *J Immunol* **156**(12): 4570-5.
- Dalod, M., Salazar-Mather, T. P., Malmgaard, L., Lewis, C., Asselin-Paturel, C., Briere, F., Trinchieri, G. and Biron, C. A. (2002). "Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo." *J Exp Med* **195**(4): 517-28.
- Davila, E. and Celis, E. (2000). "Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity." *J Immunol* **165**(1): 539-47.
- Davis, H. L., Suparto, II, Weeratna, R. R., Jumintarto, Iskandriati, D. D., Chamzah, S. S., Ma'ruf, A. A., Nente, C. C., Pawitri, D. D., Krieg, A. M., Heriyanto, Smits, W. and Sajuthi, D. D. (2000). "CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans." *Vaccine* **18**(18): 1920-4.
- Davis, H. L., Weeratna, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J., Krieg, A. M. and Weeranta, R. (1998). "CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen." *J Immunol* **160**(2): 870-6.
- Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C. and Bhardwaj, N. (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." *J Exp Med* **193**(2): 233-8.
- Dzionek, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Günther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., Okada, T., Vermi, W., Winkels, G., Yamamoto, T., Zysk, M., Yamaguchi, Y. and Schmitz, J. (2001). "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction." *J Exp Med* **194**(12): 1823-34.
- Dow, S. W., Fradkin, L. G., Liggitt, D. H., Willson, A. P., Heath, T. D. and Potter, T. A. (1999). "Lipid-DNA complexes induce potent activation of innate immune responses and antitumor activity when administered intravenously." *J Immunol* **163**(3): 1552-61.
- Doyle, S., Vaidya, S., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P., Wu, T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M., Modlin, R. and Cheng, G. (2002). "IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program." *Immunity* **17**(3): 251-63.
- Du, X., Poltorak, A., Wei, Y. and Beutler, B. (2000). "Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution." *Eur Cytokine Netw* **11**(3): 362-71.
- Dzionek, A., Inagaki, Y., Okawa, K., Nagafune, J., Rock, J. J., Sohma, Y., Winkels, G., Zysk, M., Yamaguchi, Y. and Schmitz, J. J. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions(1)." *Hum Immunol* **63**(12): 1133-48.

- Eckstein, F. (1985). "Nucleoside phosphorothioates." *Annu Rev Biochem* **54**: 367-402.
- Elkins, K. L., Rhinehart-Jones, T. R., Stibitz, S., Conover, J. S. and Klinman, D. M. (1999). "Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria." *J Immunol* **162**(4): 2291-8.
- Erickson, S., Sangfelt, O., Castro, J., Heyman, M., Einhorn, S. and Grander, D. (1999). "Interferon-alpha inhibits proliferation in human T lymphocytes by abrogation of interleukin 2-induced changes in cell cycle-regulatory proteins." *Cell Growth Differ* **10**(8): 575-82.
- Facchetti, F., De Wolf-Peeters, C., De Vos, R., van den Oord, J. J., Pulford, K. A. and Desmet, V. J. (1989a). "Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T cells) in granulomatous lymphadenitis." *Hum Pathol* **20**(6): 588-93.
- Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., Mason, D. Y., Pulford, K., van den Oord, J. J. and Desmet, V. J. (1988). "Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin." *Am J Pathol* **133**(1): 15-21.
- Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., van den Oord, J. J., de Vos, R. and Desmet, V. J. (1989b). "Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T-cells) in Kikuchi's lymphadenitis. An immunohistologic study." *Am J Clin Pathol* **92**(1): 42-50.
- Facchetti, F., De Wolf-Peeters, C., van den Oord, J. J. and Desmet, V. J. (1989c). "Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T cells) in Hodgkin's disease." *J Pathol* **158**(1): 57-65.
- Farrar, M. A. and Schreiber, R. D. (1993). "The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor." *Annu Rev Immunol* **11**: 571-611.
- Feldman, M. and Fitzgerald-Bocarsly, P. (1990). "Sequential enrichment and immunocytochemical visualization of human interferon-alpha-producing cells." *J Interferon Res* **10**(4): 435-46.
- Feller, A. C., Lennert, K., Stein, H., Bruhn, H. D. and Wuthe, H. H. (1983). "Immunohistology and aetiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Report of three instructive cases." *Histopathology* **7**(6): 825-39.
- Ferrick, D. A., Schrenzel, M. D., Mulvania, T., Hsieh, B., Ferlin, W. G. and Lepper, H. (1995). "Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo." *Nature* **373**(6511): 255-7.
- Fisch, P., Meuer, E., Pende, D., Rothenfusser, S., Viale, O., Kock, S., Ferrone, S., Fradelizi, D., Klein, G., Moretta, L., Rammensee, H. G., Boon, T., Coulie, P. and van der Bruggen, P. (1997). "Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity." *Eur J Immunol* **27**(12): 3368-79.
- Fitzgerald-Bocarsly, P. (1993). "Human natural interferon-alpha producing cells." *Pharmacol Ther* **60**(1): 39-62.
- Fong, L. and Engleman, E. G. (2000). "Dendritic cells in cancer immunotherapy." *Annu Rev Immunol* **18**: 245-73.
- Fontenau, J., Kavanagh, D., Lirvall, M., Sanders, C., Cover, T., Bhardwaj, N. and Larson, M. (2003). "Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells." *Blood* **102**(13): 4448-55.
- Gallucci, S., Lolkema, M. and Matzinger, P. (1999). "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." *Nat Med* **5**(11): 1249-55.
- Garcia, V. E., Jullien, D., Song, M., Uyemura, K., Shuai, K., Morita, C. T. and Modlin, R. L. (1998). "IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to nonpeptide [correction of nonpeptide] microbial antigens." *J Immunol* **160**(9): 4322-9.
- Garcia, V. E., Sieling, P. A., Gong, J., Barnes, P. F., Uyemura, K., Tanaka, Y., Bloom, B. R., Morita, C. T. and Modlin, R. L. (1997). "Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens." *J Immunol* **159**(3): 1328-35.
- Gauld, S. B., Dal Porto, J. M. and Cambier, J. C. (2002). "B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease." *Science* **296**(5573): 1641-2.

- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E. J. and Raulet, D. H. (2005). "The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor." *Nature* **436**(7054):1186-90. Epub 2005 Jul 3.
- Ghanekar, S., Zheng, L., Logar, A., Navratil, J., Borowski, L., Gupta, P. and Rinaldo, C. (1996). "Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and herpes simplex virus." *J Immunol* **157**(9): 4028-36.
- Gilliet, M. and Liu, Y. J. (2002a). "Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells." *J Exp Med* **195**(6): 695-704.
- Gilliet, M. and Liu, Y. J. (2002b). "Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells." *Hum Immunol* **63**(12): 1149-55.
- Gopcsa, L., Banyai, A., Jakab, K., Kormos, L., Tamaska, J., Matolcsy, A., Gogolak, P., Rajnavolgyi, E. and Paloczi, K. (2005). " Extensive flow cytometric characterization of plasmacytoid dendritic cell leukemia cells." *Eur J Haematol* **75**(4):346-51.
- Gotch, F., Rothbard, J., Howland, K., Townsend, A. and McMichael, A. (1987). "Cytotoxic T lymphocytes recognize a fragment of influenza virus matrix protein in association with HLA-A2." *Nature* **326**(6116): 881-2.
- Greenberg, S. A., Pinkus, J. L., Pinkus, G. S., Burleson, T., Sanoudou, D., Tawil, R., Barohn, R. J., Saperstein, D. S., Briemberg, H. R., Ericsson, M., Park, P. and Amato, A. A. (2005). " Interferon-alpha/beta-mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis." *Ann Neurol* **57**(5):664-78.
- Groh, V., Steinle, A., Bauer, S. and Spies, T. (1998). "Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells." *Science* **279**(5357): 1737-40.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M. S., Riddell, S. R. and Spies, T. (2001). "Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells." *Nat Immunol* **2**(3):255-60.
- Grouard, G., Rissoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J. and Liu, Y. J. (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." *J Exp Med* **185**(6): 1101-11.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. and Amigorena, S. (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **20**: 621-67.
- Gursel, M., Verthelyi, D., Gursel, I., Ishii, K. J. and Klinman, D. M. (2002a). "Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide." *J Leukoc Biol* **71**(5): 813-20.
- Gursel, M., Verthelyi, D. and Klinman, D. M. (2002b). "CpG oligodeoxynucleotides induce human monocytes to mature into functional dendritic cells." *Eur J Immunol* **32**(9): 2617-22.
- Guthridge, M. A., Stomski, F. C., Thomas, D., Woodcock, J. M., Bagley, C. J., Berndt, M. C. and Lopez, A. F. (1998). "Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors." *Stem Cells* **16**(5): 301-13.
- Hacker, H. (2000). "Signal transduction pathways activated by CpG-DNA." *Curr Top Microbiol Immunol* **247**: 77-92.
- Hacker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Lipford, G. B. and Wagner, H. (1998). "CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation." *Embo J* **17**(21): 6230-40.
- Hacker, H., Vabulas, R. M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S. and Wagner, H. (2000). "Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6." *J Exp Med* **192**(4): 595-600.
- Han, J., Zhu, Z., Hsu, C. and Finley, W. H. (1994). "Selection of antisense oligonucleotides on the basis of genomic frequency of the target sequence." *Antisense Res Dev* **4**(1): 53-65.

- Hartmann, G., Battiany, J., Poeck, H., Wagner, M., Kerkmann, M., Lubenow, N., Rothenfusser, S. and Endres, S. (2003). "Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **33**(6): 1633-41.
- Hartmann, G. and Krieg, A. M. (1999a). "CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes." *Gene Ther* **6**(5): 893-903.
- Hartmann, G. and Krieg, A. M. (2000a). "Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells." *J Immunol* **164**(2): 944-53.
- Hartmann, G., Weeratna, R. D., Ballas, Z. K., Payette, P., Blackwell, S., Suparto, I., Rasmussen, W. L., Waldschmidt, M., Sajuthi, D., Purcell, R. H., Davis, H. L. and Krieg, A. M. (2000b). "Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo." *J Immunol* **164**(3): 1617-24.
- Hartmann, G., Weiner, G. J. and Krieg, A. M. (1999b). "CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9305-10.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L. and Anderson, K. V. (1988). "The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." *Cell* **52**(2): 269-79.
- Hayashi, F., 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. (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." *Nature* **410**(6832): 1099-103.
- Hayday, A. C. (2000). "gd cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection." *Annu Rev Immunol* **18**: 975-1026.
- Heaton, K. M. and Grimm, E. A. (1993). "Cytokine combinations in immunotherapy for solid tumors: a review." *Cancer Immunol Immunother* **37**(4):213-9.
- Heckelsmiller, K., Beck, S., Rall, K., Sipos, B., Schlamp, A., Tuma, E., Rothenfusser, S., Endres, S. and Hartmann, G. (2002a). "Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy." *Eur J Immunol* **32**(11): 3235-45.
- Heckelsmiller, K., Rall, K., Beck, S., Schlamp, A., Seiderer, J., Jahrsdorfer, B., Krug, A., Rothenfusser, S., Endres, S. and Hartmann, G. (2002b). "Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model." *J Immunol* **169**(7): 3892-9.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochreiner, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. and Bauer, S. (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8." *Science* **303**(5663): 1481-2.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K. and Akira, S. (2003). "The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets." *J Immunol* **170**(6): 3059-64.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. and Akira, S. (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." *Nat Immunol* **3**(2): 196-200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* **408**(6813): 740-5.
- Hochrein, H., O'Keeffe, M. and Wagner, H. (2002). "Human and mouse plasmacytoid dendritic cells." *Hum Immunol* **63**(12): 1103-10.
- Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A. and Medzhitov, R. (2002). "The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors." *Nature* **420**(6913): 329-33.

- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G. (2002). "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides." *J Immunol* **168**(9): 4531-7.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira, S. (1999). "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product." *J Immunol* **162**(7): 3749-52.
- Iho, S., Yamamoto, T., Takahashi, T. and Yamamoto, S. (1999). "Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cells to induce IFN-gamma production in vitro." *J Immunol* **163**(7): 3642-52.
- Ikuta, K., Kina, T., MacNeil, I., Uchida, N., Peault, B., Chien, Y. H. and Weissman, I. L. (1990). "A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells." *Cell* **62**(5): 863-74.
- Inohara, N. and Nunez, G. (2003). "NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis." *Nat Rev Immunol* **3**(5): 371-82.
- Imler, J. L. and Hoffmann, J. A. (2003). "Toll signaling: the TIRless quest for specificity." *Nat Immunol* **4**(2): 105-6.
- Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957). "Virus interference. I. The interferon." *Proc R Soc Lond* **147**: 258.
- Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1987). "Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957." *J Interferon Res* **7**(5): 429-38.
- Ismaili, J., Oliislagers, V., Poupot, R., Fournie, J. J. and Goldman, M. (2002). "Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation." *Clin Immunol* **103**(3 Pt 1): 296-302.
- Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., Ozaki, Y., Tomizawa, H., Akira, S. and Fukuhara, S. (2002). "Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets." *J Exp Med* **195**(11): 1507-12.
- Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., Saeland, S., Fukuhara, S. and Ikehara, S. (1999). "A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells." *J Immunol* **163**(3): 1409-19.
- Ito T, Amakawa R, Inaba M, Hori T, Ota M, Nakamura K, Takebayashi M, Miyaji M, Yoshimura T, Inaba K, Fukuhara S. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs." *J Immunol* **172**(7):4253-9.
- Jager, E., Hohn, H., Necker, A., Forster, R., Karbach, J., Freitag, K., Neukirch, C., Castelli, C., Salter, R. D., Knuth, A. and Maeurer, M. J. (2002). "Peptide-specific CD8+ T-cell evolution in vivo: response to peptide vaccination with Melan-A/MART-1." *Int J Cancer* **98**(3): 376-88.
- Jahrsdorfer, B., Hartmann, G., Racila, E., Jackson, W., Muhlenhoff, L., Meinhardt, G., Endres, S., Link, B. K., Krieg, A. M. and Weiner, G. J. (2001). "CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens." *J Leukoc Biol* **69**(1): 81-8.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." *Immunol Today* **13**(1): 11-6.
- Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2001). "Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **31**(11): 3388-93.
- Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Groh, V., Spies, T., Kimura, R., Miyagi, T., Mochizuki, K., Sasaki, Y. and Hayashi, N. (2003). "Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid." *Int J Cancer* **104**(3):354-61.

- Jitsukawa, S., Faure, F., Lipinski, M., Triebel, F. and Hercend, T. (1987). "A novel subset of human lymphocytes with a T cell receptor-gamma complex." *J Exp Med* **166**(4): 1192-7.
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G. and Bauer, S. (2002). "Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848." *Nat Immunol* **3**(6): 499.
- Kadowaki, N., Antonenko, S. and Liu, Y. J. (2001a). "Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN." *J Immunol* **166**(4): 2291-5.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F. and Liu, Y. J. (2001b). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens." *J Exp Med* **194**(6): 863-9.
- Kadowaki, N. and Liu, Y. J. (2002). "Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity." *Hum Immunol* **63**(12): 1126-32.
- Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K. and Akira, S. (2001). "Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells." *J Immunol* **166**(9): 5688-94.
- Kambayashi, T., Assarsson, E., Michaëlsson, J., Berglund, P., Diehl, A. D., Chambers, B. J. and Ljunggren, H. G. (2000). "Emergence of CD8+ T cells expressing NK cell receptors in influenza A virus-infected mice." *J Immunol* **165**(9): 4964-9.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999). "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." *Immunity* **11**(1): 115-22.
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P. F., Sato, S., Hoshino, K. and Akira, S. (2001). "Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes." *J Immunol* **167**(10): 5887-94.
- Kerkemann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G. (2003). "Activation with CpG-A and CpG-B Oligonucleotides Reveals Two Distinct Regulatory Pathways of Type I IFN Synthesis in Human Plasmacytoid Dendritic Cells." *J Immunol* **170**(9): 4465-74.
- Kim, H. A., Ko, H. M., Ju, H. W., Kim, K. J., Roh, S. G., Lee, H. K. and Im, S. Y. (2009). "CpG-ODN-based immunotherapy is effective in controlling the growth of metastasized tumor cells." *Cancer Lett.* **274**(1): 160-4.
- Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H. L., Weissman, I. L. and Yokoyama, W. M. (2000). "In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6): 2731-6.
- Kim, S. K., Ragupathi, G., Musselli, C., Choi, S. J., Park, Y. S. and Livingston, P. O. (1999). "Comparison of the effect of different immunological adjuvants on the antibody and T-cell response to immunization with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugate cancer vaccines." *Vaccine* **18**(7-8): 597-603.
- Kirkwood, J. (2002). "Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience." *Semin Oncol.* **29**(3 Suppl 7): 18-26.
- Klinman, D. M., Takeshita, F., Gursel, I., Leifer, C., Ishii, K. J., Verthelyi, D. and Gursel, M. (2002). "CpG DNA: recognition by and activation of monocytes." *Microbes Infect* **4**(9): 897-901.
- Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J. and Krieg, A. M. (1996). "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**(7): 2879-83.
- Kranzer, K., Bauer, M., Lipford, G. B., Heeg, K., Wagner, H. and Lang, R. (2000). "CpG-oligodeoxynucleotides enhance T-cell receptor-triggered interferon-gamma production and up-regulation of CD69 via induction of antigen-presenting cell-derived interferon type I and interleukin-12." *Immunology* **99**(2): 170-8.

- Krieg, A. M. (2002). "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." *Annu Rev Immunol* **20**: 709-60.
- Krieg, A. M., Love-Homan, L., Yi, A. K. and Harty, J. T. (1998a). "CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge." *J Immunol* **161**(5): 2428-34.
- Krieg, A. M., Wu, T., Weeratna, R., Efler, S. M., Love-Homan, L., Yang, L., Yi, A. K., Short, D. and Davis, H. L. (1998b). "Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12631-6.
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. and Klinman, D. M. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." *Nature* **374**: 546-9.
- Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z. K., Endres, S., Krieg, A. M. and Hartmann, G. (2001a). "Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **31**(7): 2154-63.
- Krug, A., Rothenfusser, S., Selinger, S., Bock, C., Kerkmann, M., Battiany, J., Sarris, A., Giese, T., Speiser, D., Endres, S. and Hartmann, G. (2003). "CpG-A oligonucleotides induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells." *J Immunol* **170**(7): 3468-77.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A. M. and Hartmann, G. (2001b). "Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12." *Eur J Immunol* **31**(10): 3026-37.
- Kunikata, N., Sano, K., Honda, M., Ishii, K., Matsunaga, J., Okuyama, R., Takahashi, K., Watanabe, H., Tamura, G., Tagami, H. and Terui, T. (2004). "Peritumoral CpG oligodeoxynucleotide treatment inhibits tumor growth and metastasis of B16F10 melanoma cells." *J Invest Dermatol* **123**(2):395-402.
- Kunikata, T., Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Ushio, C., Yamauchi, H., Ikeda, M., Ikegami, H. and Kurimoto M. (1998). "Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody." *Cell Immunol* **189**(2):135-43.
- Kuramoto, E., Yano, O., Kimura, Y., Baba, M., Makino, T., Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T. and Tokunaga, T. (1992). "Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation." *Jpn J Cancer Res* **83**(11): 1128-31.
- 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. (2000). "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus." *Nat Immunol* **1**(5): 398-401.
- Ladel, C. H., Blum, C. and Kaufmann, S. H. (1996). "Control of natural killer cell-mediated innate resistance against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* by gamma/delta T lymphocytes." *Infect Immun* **64**(5): 1744-9.
- Lanier, L. L. (1998). "NK cell receptors." *Annu Rev Immunol* **16**: 359-93.
- Latz, E., Visintin, A., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Kurt-Jones, E. A., Golenbock, D. T. and Espevik, T. (2002). "Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction." *J Biol Chem* **277**(49): 47834-43.
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F. and Tough, D. F. (2001). "Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo." *Immunity* **14**(4): 461-70.
- Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M. J. and Marshak-Rothstein, A. (2002). "Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors." *Nature* **416**(6881): 603-7.

- Lee, P. P., Yee, C., Savage, P. A., Fong, L., Brockstedt, D., Weber, J. S., Johnson, D., Swetter, S., Thompson, J., Greenberg, P. D., Roederer, M. and Davis, M. M. (1999). "Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients." *Nat Med* **5**(6): 677-85.
- Lee, S. W., Song, M. K., Baek, K. H., Park, Y., Kim, J. K., Lee, C. H., Cheong, H. K., Cheong, C. and Sung, Y. C. (2000). "Effects of a hexameric deoxyriboguanosine run conjugation into CpG oligodeoxynucleotides on their immunostimulatory potentials." *J Immunol* **165**(7): 3631-9.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* **86**(6): 973-83.
- Lennert, K. and Remmeli, W. (1958). "Karyometrische Untersuchungen an Lymphknotenzellen des Menschen." *Acta Haematologica* **19**: 99-113.
- Leslie, D. S., Vincent, M. S., Spada, F. M., Das, H., Sugita, M., Morita, C. T. and Brenner, M. B. (2002). "CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells." *J Exp Med* **196**(12): 1575-84.
- Link, B. K., Ballas, Z. K., Weisdorf, D., Wooldridge, J. E., Bossler, A. D., Shannon, M., Rasmussen, W. L., Krieg, A. M. and Weiner, G. J. (2006). "Oligodeoxynucleotide CpG 7909 delivered as intravenous infusion demonstrates immunologic modulation in patients with previously treated non-Hodgkin lymphoma." *J Immunother* **29**(5):558-68.
- Lipford, G. B., Bauer, M., Blank, C., Reiter, R., Wagner, H. and Heeg, K. (1997). "CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants." *Eur J Immunol* **27**(9): 2340-4.
- Lipford, G. B., Bendigs, S., Heeg, K. and Wagner, H. (2000a). "Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines." *Immunology* **101**(1): 46-52.
- Lipford, G. B., Sparwasser, T., Zimmermann, S., Heeg, K. and Wagner, H. (2000b). "CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses." *J Immunol* **165**(3): 1228-35.
- Liu, C., Lou, Y., Lizée, G., Qin, H., Liu, S., Rabinovich, B., Kim, G.J., Wang, Y. H., Ye, Y., Sikora, A. G., Overwijk, W. W., Liu, Y. J., Wang, G. and Hwu, P. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice." *J Clin Invest* **118**(3):1165-75.
- Ljunggren, H. G. and Karre, K. (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." *Immunol Today* **11**(7): 237-44.
- Long, E. O. (1999). "Regulation of immune responses through inhibitory receptors." *Annu Rev Immunol* **17**: 875-904.
- Lopez-Botet, M., Perez-Villar, J. J., Carretero, M., Rodriguez, A., Melero, I., Bellon, T., Llano, M. and Navarro, F. (1997). "Structure and function of the CD94 C-type lectin receptor complex involved in recognition of HLA class I molecules." *Immunol Rev* **155**: 165-74.
- Lorza, M. J., Metalitsa, L. S. and Perussia, B. (2002). "NKT and T cells: coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production." *Eur J Immunol* **32**(12): 3453-62.
- Lozzio, C. B. and Lozzio, B. B. (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." *Blood* **45**(3): 321-34.
- Macfarlane, D. E. and Manzel, L. (1998). "Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds." *J Immunol* **160**(3): 1122-31.
- Manetti, R., Gerosa, F., Giudizi, M. G., Biagiotti, R., Parronchi, P., Piccinni, M. P., Sampognaro, S., Maggi, E., Romagnani, S. and Trinchieri, G. (1994). "Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones." *J Exp Med* **179**(4):1273-83.

- Manzel, L. and Macfarlane, D. E. (1998). "CpG-oligodeoxynucleotide supports growth of IL-6-dependent 7TD1 murine hybridoma cells." *Life Sci* **62**(1): 23-7.
- Marrack, P., Kappler, J. and Mitchell, T. (1999). "Type I interferons keep activated T cells alive." *J Exp Med* **189**(3): 521-30.
- Marschner, A., Rotheffusser, S., Hornung, V., Prell, D., Krug, A., Kerkemann, M., Wellisch, D., Poeck, H., Greinacher, A., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G. (2005). "CpG ODN enhance antigen-specific NKT cell activation via plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **35**(8): 2347-57.
- Maxwell, J. R., Weinberg, A., Prell, R. A. and Vella, A. T. (2000). "Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion." *J Immunol* **164**(1): 107-12.
- Mayordomo, J. I., Zorina, T., Storkus, W. J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L. D., Melief, C. J., Ildstad, S. T., Kast, W. M., Deleo, A. B. et al. (1995). "Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity." *Nat Med* **1**(12): 1297-302.
- McRae, B. L., Beilfuss, B. A. and van Sechteren, G. A. (2000). "IFN-beta differentially regulates CD40-induced cytokine secretion by human dendritic cells." *J Immunol* **164**(1): 23-8.
- Medzhitov, R. and Janeway, C. A., Jr. (1997a). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." *Curr Opin Immunol* **9**(1): 4-9.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A., Jr. (1997b). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* **388**(6640): 394-7.
- Mellman, I. and Steinman, R. M. (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." *Cell* **106**(3): 255-8.
- Messina, J. P., Gilkeson, G. S. and Pisetsky, D. S. (1991). "Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA." *J Immunol* **147**(6): 1759-64.
- Messina, J. P., Gilkeson, G. S. and Pisetsky, D. S. (1993). "The influence of DNA structure on the in vitro stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucleotide antigens." *Cell Immunol* **147**(1): 148-57.
- Miconnet, I., Koenig, S., Speiser, D., Krieg, A., Guillaume, P., Cerottini, J. C. and Romero, P. (2002). "CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide." *J Immunol* **168**(3): 1212-8.
- Mingari, M. C., Poggi, A., Biassoni, R., Bellomo, R., Ciccone, E., Pella, N., Morelli, L., Verdiani, S., Moretta, A. and Moretta, L. (1991). "In vitro proliferation and cloning of CD3- CD16+ cells from human thymocyte precursors." *J Exp Med* **174**(1): 21-6.
- Moldoveanu, Z., Love-Homan, L., Huang, W. Q. and Krieg, A. M. (1998). "CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus." *Vaccine* **16**(11-12): 1216-24.
- Mombaerts, P., Arnoldi, J., Russ, F., Tonegawa, S. and Kaufmann, S. H. (1993). "Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen." *Nature* **365**(6441): 53-6.
- Morales, A., Eidinger, D. and Bruce, A. W. (1976). "Intracavitary *Bacillus Calmette-Guerin* in the treatment of superficial bladder tumors." *J Urol* **116**(2): 180-3.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M. C. and Moretta, L. (1996). "Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells." *Annu Rev Immunol* **14**: 619-48.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M. and Aguet, M. (1994). "Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense." *Science* **264**(5167): 1918-21.
- Murphy, K. M. and Reiner, S. L. (2002). "The lineage decisions of helper T cells." *Nat Rev Immunol* **2**(12): 933-44.

- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P. and Mantovani, A. (2000). "Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells." *J Immunol* **164**(11): 5998-6004.
- Nakata, M., Smyth, M. J., Norihisa, Y., Kawasaki, A., Shinkai, Y., Okumura, K. and Yagita, H. (1990). "Constitutive expression of pore-forming protein in peripheral blood gamma/delta T cells: implication for their cytotoxic role in vivo." *J Exp Med* **172**(6): 1877-80.
- Nauts, H. C. and McLaren, J. R. (1990). "Coley toxins--the first century." *Adv Exp Med Biol* **267**: 483-500.
- Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K. and Akira, S. (2000). "Cutting Edge: Endotoxin Tolerance in Mouse Peritoneal Macrophages Correlates with Down-Regulation of Surface Toll-Like Receptor 4 Expression." *J Immunol* **164**(7): 3476-3479.
- Nomura, N., Miyajima, N., Sazuka, T., Tanaka, A., Kawarabayasi, Y., Sato, S., Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K. and Tabata, S. (1994). "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1." *DNA Res* **1**(1): 27-35.
- O'Doherty, U., Peng, M., Gezelter, S., Swiggard, W. J., Betjes, M., Bhardwaj, N. and Steinman, R. M. (1994). "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature." *Immunology* **82**(3): 487-93.
- Ogata, H., Su, I., Miyake, K., Nagai, Y., Akashi, S., Mecklenbrauker, I., Rajewsky, K., Kimoto, M. and Tarakhovsky, A. (2000). "The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells." *J Exp Med* **192**(1): 23-9.
- Ogg, G. S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P. R., Nowak, M. A., Monard, S., Segal, J. P., Cao, Y., Rowland-Jones, S. L., Cerundolo, V., Hurley, A., Markowitz, M., Ho, D. D., Nixon, D. F. and McMichael, A. J. (1998). "Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA." *Science* **279**(5359): 2103-6.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S. and Kolb, H. (2000). "Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex." *J Immunol* **164**(2): 558-61.
- Ohsugi, Y., Gershwin, M. E., Owens, R. B. and Nelson-Rees, W. A. (1980). "Tumorigenicity of human malignant lymphoblasts: comparative study with unmanipulated nude mice, antilymphocyte serum-treated nude mice, and X-irradiated nude mice." *J Natl Cancer Inst* **65**(4): 715-8.
- Okamura, H., Tsutsui, H., Kashiwamura, S., Yoshimoto, T. and Nakanishi, K. (1998). "Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity." *Adv Immunol* **70**: 281-312.
- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., Young, D. W., Ishizaka, S. T., Rose, J., Chow, J. C. and Strauss, J. F., 3rd (2001). "The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4." *J Biol Chem* **276**(13): 10229-33.
- Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P. A., Carballido, J., Picker, L. J. and Lund-Johansen, F. (1997). "Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12551-6.
- Ortaldo, J. R., Mantovani, A., Hobbs, D., Rubinstein, M., Pestka, S. and Herberman, R. B. (1983). "Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes." *Int J Cancer* **31**(3): 285-9.
- O'Sullivan, B., R. Thomas. (2003). "CD40 and dendritic cell function." *Crit. Rev. Immunol.* **23**: 83-107.

- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. and Seya, T. (2003). "TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction." *Nat Immunol* **4**(2): 161-167.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L. and Aderem, A. (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13766-71.
- Peiser, L., Mukhopadhyay, S. and Gordon, S. (2002). "Scavenger receptors in innate immunity." *Curr Opin Immunol* **14**(1): 123-8.
- Perussia, B., Fanning, V. and Trinchieri, G. (1985). "A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses." *Nat Immun Cell Growth Regul* **4**(3): 120-37.
- Pestka, S. (2000). "The human interferon alpha species and receptors." *Biopolymers* **55**(4): 254-87.
- Pinkoski, M. J., Hobmann, M., Heibein, J. A., Tomaselli, K., Li, F., Seth, P., Froelich, C., J. and Bleackley, R., C. (1998). "Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis." *Blood* **92**(3):1044-54.
- Pittet, M. J., Speiser, D. E., Valmori, D., Cerottini, J. C. and Romero, P. (2000). "Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+ T cells closely correlates with CD56 surface expression." *J Immunol* **164**(3): 1148-52.
- Pittet, M. J., Valmori, D., Dunbar, P. R., Speiser, D. E., Lienard, D., Lejeune, F., Fleischhauer, K., Cerundolo, V., Cerottini, J. C. and Romero, P. (1999). "High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals." *J Exp Med* **190**(5): 705-15.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Huffel, C. V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science* **282**(5396): 2085-8.
- Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P. and Malo, D. (1999). "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)." *J Exp Med* **189**(4): 615-25.
- Raulet, D. H. (2003). "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands." *Nat Rev Immunol* **3**(10):781-90.
- Redford, T. W., Yi, A. K., Ward, C. T. and Krieg, A. M. (1998). "Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides." *J Immunol* **161**(8): 3930-5.
- Rissoan, M. C., Duhen, T., Bridon, J. M., Bendriss-Vermare, N., Péronne, C., de Saint Vis, B., Brière, F., Bates, E. E. (2002). "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**(9):3295-303.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. and Bazan, J. F. (1998). "A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(2): 588-93.
- Rodewald, H. R., Moingeon, P., Lucich, J. L., Dosiou, C., Lopez, P. and Reinherz, E. L. (1992). "A population of early fetal thymocytes expressing Fc gamma RII/III contains precursors of T lymphocytes and natural killer cells." *Cell* **69**(1): 139-50.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M. and Schuler, G. (1994). "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." *J Exp Med* **180**(1): 83-93.
- Rönnblom L, Alm GV. (2002). "The natural interferon-alpha producing cells in systemic lupus erythematosus." *Hum Immunol* **63**(12):1181-93.

- Rothenfusser, S., Tuma, E., Endres, S. and Hartmann G. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG." *Hum Immunol* **63**(12):1111-9.
- Rothenfusser, S., Hornung, V., Ayyoub, M., Britsch, S., Towarowski, A., Krug, A., Sarris, A., Lubenow, N., Speiser, D., Endres, S. and Hartmann, G. (2003) " CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8+ T-cell responses in vitro." *Blood* **103**(6):2162-9.
- Russel, J. H. and Ley, T. J. (2002). " Lymphocyte-mediated cytotoxicity." *Annu Rev Immunol* **20**:323-70.
- Saito, H., Kranz, D. M., Takagaki, Y., Hayday, A. C., Eisen, H. N. and Tonegawa, S. (1984). "Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences." *Nature* **309**: 757-762.
- Salter, R. D., Howell, D. N. and Cresswell, P. (1985). "Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids." *Immunogenetics* **21**(3): 235-46.
- Sarris, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Prell, D., Krug, A., Kerkemann, M., Wellisch, D., Poeck, H., Greinacher, A., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G. (2005). " CpG ODN enhance antigen-specific NKT cell activation via plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **35**(8): 2347-57.
- Schetter, C. (2003). Recent progress in the understanding and clinical development of immunostimulatory oligonucleotides. Workshop of the Paul Martini Foundation: "Therapeutic oligonucleotides in drug development", Berlin-Brandenburg Academy of Sciences; Berlin.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J. and Schreiber, R. D. (2001). "IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." *Nature* **410**(6832): 1107-11.
- Shirota, H., Sano, K., Kikuchi, T., Tamura, G. and Shirato, K. (2000). "Regulation of murine airway eosinophilia and Th2 cells by antigen-conjugated CpG oligodeoxynucleotides as a novel antigen-specific immunomodulator" *J Immunol* **164**(11):5575-82.
- Shortman, K. and Heath, W. R. (2001). "Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells." *Nat Immunol* **2**(11): 988-9.
- Shortman, K. and Liu, Y. J. (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." *Nat Rev Immunol* **2**(3): 151-61.
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. and Liu, Y. J. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." *Science* **284**(5421): 1835-7.
- Sparwasser, T., Koch, E. S., Vabulas, R. M., Heeg, K., Lipford, G. B., Ellwart, J. W. and Wagner, H. (1998). "Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells." *Eur J Immunol* **28**(6): 2045-54.
- Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Hacker, H., Heeg, K. and Wagner, H. (1997). "Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock." *Eur J Immunol* **27**(7): 1671-9.
- Speiser, D. E., Pittet, M. J., Valmori, D., Dunbar, R., Rimoldi, D., Liénard, D., MacDonald, H. R., Cerottini, J. C., Cerundolo, V. and Romero, P. (1999). " In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes." *J Exp Med* **190**(6):775-82.
- Spits, H., Couwenberg, F., Bakker, A. Q., Weijer, K. and Uittenbogaart, C. H. (2000). "Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2." *J Exp Med* **192**(12): 1775-84.
- Squier, M. K. and Cohen, J. J. (1994). "Cell-mediated cytotoxic mechanisms." *Curr Opin Immunol* **6**(3): 447-52.
- Stacey, K. J., Sester, D. P., Sweet, M. J. and Hume, D. A. (2000). "Macrophage activation by immunostimulatory DNA." *Curr Top Microbiol Immunol* **247**: 41-58.

- Starr, S. E., Bandyopadhyay, S., Shanmugam, V., Hassan, N., Douglas, S., Jackson, S. J., Trinchieri, G. and Chehimi, J. (1993). "Morphological and functional differences between HLA-DR+ peripheral blood dendritic cells and HLA-DR+ IFN-alpha producing cells." *Adv Exp Med Biol* **329**: 173-8.
- Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *J Exp Med* **137**(5): 1142-62.
- Sugaya, M., Nakamura, K. and Tamaki, K. (1999). "Interleukins 18 and 12 synergistically upregulate interferon-gamma production by murine dendritic epidermal T cells." *J Invest Dermatol* **113**(3): 350-4.
- Sun, S., Cai, Z., Langlade-Demoyen, P., Kosaka, H., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A. and Sprent, J. (1996). "Dual function of Drosophila cells as APCs for naive CD8+ T cells: implications for tumor immunotherapy." *Immunity* **4**(6): 555-64.
- Sun, S., Beard, C., Jaenisch, R., Jones, P. and Sprent, J. (1997). "Mitogenicity of DNA from different organisms for murine B cells." *J Immunol* **159**(7): 3119-25.
- Sun, S., Zhang, X., Tough, D. and Sprent, J. (2000). "Multiple effects of immunostimulatory DNA on T cells and the role of type I interferons." *Springer Semin Immunopathol* **22**(1-2): 77-84.
- Sun, S., Zhang, X., Tough, D. F. and Sprent, J. (1998). "Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA." *J Exp Med* **188**(12): 2335-42.
- Svensson, H., Johannsson, A., Nikkila, T., Alm, G. V. and Cederblad, B. (1996). "The cell surface phenotype of human natural interferon-alpha producing cells as determined by flow cytometry." *Scand J Immunol* **44**(2): 164-72.
- Taguchi, T., Mitcham, J. L., Dower, S. K., Sims, J. E. and Testa, J. R. (1996). "Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14." *Genomics* **32**(3): 486-8.
- Takeshita, F., Leifer, C. A., Gursel, I., Ishii, K. J., Takeshita, S., Gursel, M. and Klinman, D. M. (2001). "Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells." *J Immunol* **167**(7): 3555-8.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999a). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." *Immunity* **11**(4): 443-51.
- Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P. F. and Akira, S. (2000). "Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway." *J Immunol* **164**(2): 554-7.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Takeda, K. and Akira, S. (1999b). "TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family." *Gene* **231**(1-2): 59-65.
- Tamm, I., Dorken, B. and Hartmann, G. (2001). "Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea?" *Lancet* **358**(9280): 489-97.
- Tanaka, Y., Morita, C. T., Nieves, E., Brenner, M. B. and Bloom, B. R. (1995). "Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells." *Nature* **375**(6527): 155-8.
- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C. and Simon, J. C. (2002). "Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4." *J Exp Med* **195**(1): 99-111.
- Testi, R., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. (1989). "Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca⁺⁺] and stimulation of protein kinase C." *J Immunol* **142**(6): 1854-60.
- Thoma-Uzynski, S., Kiertscher, S. M., Ochoa, M. T., Bouis, D. A., Norgard, M. V., Miyake, K., Godowski, P. J., Roth, M. D. and Modlin, R. L. (2000). "Activation of toll-like

- receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10." *J Immunol* **165**(7): 3804-10.
- Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T. and Sudo, T. (1984). "Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity." *J Natl Cancer Inst* **72**: 955-62.
- Tokunaga, T., Yamamoto, S. and Namba, K. (1988). "A synthetic single-stranded DNA, poly(dG,dC), induces interferon-alpha/beta and -gamma, augments natural killer activity, and suppresses tumor growth." *Jpn J Cancer Res* **79**(6): 682-6.
- Tokunaga, T., Yamamoto, T. and Yamamoto, S. (1999). "How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA." *Jpn J Infect Dis* **52**(1): 1-11.
- Tominaga, K., Yoshimoto, T., Torigoe, K., Kurimoto, M., Matsui, K., Hada, T., Okamura, H. and Nakanishi, K. (2000). "IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells." *Int Immunol* **12**(2):151-60.
- Toshchakov, V., Jones, B. W., Perera, P. Y., Thomas, K., Cody, M. J., Zhang, S., Williams, B. R., Major, J., Hamilton, T. A., Fenton, M. J. and Vogel, S. N. (2002). "TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages." *Nat Immunol* **3**(4): 392-8.
- Tough, D. F., Borrow, P. and Sprent, J. (1996). "Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo." *Science* **272**(5270): 1947-50.
- Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." *Adv Immunol* **47**: 187-376.
- Trinchieri, G. (1995). "Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis." *Semin Immunol* **7**(2): 83-8.
- Underhill, D. M. (2003). "Mini-review Toll-like receptors: networking for success." *Eur J Immunol* **33**(7): 1767-75.
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Smith, K. D. and Aderem, A. (1999). "Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14459-63.
- Vabulas, R. M., Pircher, H., Lipford, G. B., Hacker, H. and Wagner, H. (2000). "CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses." *J Immunol* **164**(5): 2372-8.
- Valmori, D., Fonteneau, J. F., Lizana, C. M., Gervois, N., Lienard, D., Rimoldi, D., Jongeneel, V., Jotereau, F., Cerottini, J. C. and Romero, P. (1998). "Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues." *J Immunol* **160**(4): 1750-8.
- Verthelyi, D., Ishii, K., Gursel, M., Takeshita, F. and Klinman, D. (2001). "Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs." *J Immunol* **166**(4): 2372-7.
- Verthelyi, D., Kenney, R. T., Seder, R. A., Gam, A. A., Friedag, B. and Klinman, D. M. (2002). "CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates." *J Immunol* **168**(4): 1659-63.
- Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J. H., Wyllie, D. H., Dower, S. K. and Segal, D. M. (2001). "Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells." *J Immunol* **166**(1): 249-55.
- Walker, P. S., Scharton-Kersten, T., Krieg, A. M., Love-Homan, L., Rowton, E. D., Udey, M. C. and Vogel, J. C. (1999). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-gamma-dependent mechanisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6970-5.
- Wallace, M., Malkovsky, M. and Carding, S. R. (1995). "Gamma/delta T lymphocytes in viral infections." *J Leukoc Biol* **58**(3): 277-83.
- Werlen, G. and Palmer, E. (2002). "The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity." *Curr Opin Immunol* **14**(3): 299-305.

- Wickstrom, E. (1997). "Antisense c-myc inhibition of lymphoma growth." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **7**(3): 225-8.
- Wiemann, B. and Starnes, C. O. (1994). "Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective." *Pharmacol Ther* **64**(3): 529-64.
- Williams, M. J., Rodriguez, A., Kimbrell, D. A. and Eldon, E. D. (1997). "The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense." *Embo J* **16**(20): 6120-30.
- Wollenberg, A., Wagner, M., Günther, S., Towarowski, A., Tuma, E., Moderer, M., Rothenfusser, S., Wetzel, S., Endres, S. and Hartmann, G. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases." *J Invest Dermatol* **119**(5):1096-102.
- Wooldridge, J. E., Ballas, Z., Krieg, A. M. and Weiner, G. J. (1997). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma." *Blood* **89**(8): 2994-8.
- Xu, Y. and Song, G. (2004). "The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation." *J Biomed Sci* **11**(4):426-38.
- Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Watase, T., Busch, D. H., Pamer, E. G., Kuwano, H. and Yoshikai, Y. (2002). "Overexpression of IL-15 in vivo increases antigen-driven memory CD8+ T cells following a microbe exposure." *J Immunol* **168**(3): 1198-203.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. and Akira, S. (2002a). "Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4." *Nature* **420**(6913): 324-9.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. and Akira, S. (2002b). "Cutting Edge: A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That Preferentially Activates the IFN-beta Promoter in the Toll-Like Receptor Signaling." *J Immunol* **169**(12): 6668-72.
- Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O. and Tokunaga, T. (1992a). "Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity." *J Immunol* **148**(12): 4072-6.
- Yamamoto, S., Yamamoto, T., Shimada, S., Kuramoto, E., Yano, O., Kataoka, T. and Tokunaga, T. (1992b). "DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth." *Microbiol Immunol* **36**: 983-97.
- Yamamoto, T., Yamamoto, S., Kataoka, T., Komuro, K., Kohase, M. and Tokunaga, T. (1994). "Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro." *Jpn J Cancer Res* **85**: 775-9.
- Yoneyama, M. and Fujita, T. (2004). "Rig-I: critical regulator for virus-induced innate immunity" *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **49**(16): 2571-8.
- Yoshimoto, T., Okamura, H., Tagawa, Y. I., Iwakura, Y. and Nakanishi K. (1997) "Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8):3948-53.
- Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S. and Nakanishi K. (1998). "IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production." *J Immunol* **161**(7):3400-7.
- Yi, A. K., Chang, M., Peckham, D. W., Krieg, A. M. and Ashman, R. F. (1998a). "CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry." *J Immunol* **160**(12): 5898-906.
- Yi, A. K., Hornbeck, P., Lafrenz, D. E. and Krieg, A. M. (1996a). "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**(11): 4918-25.
- Yi, A. K., Klinman, D. M., Martin, T. L., Matson, S. and Krieg, A. M. (1996b). "Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway." *J Immunol* **157**(12): 5394-402.
- Yi, A. K., Tuetken, R., Redford, T., Waldschmidt, M., Kirsch, J. and Krieg, A. M. (1998b). "CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species." *J Immunol* **160**(10): 4755-61.
- Yokoyama, W. M. and Seaman, W. E. (1993). "The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex." *Annu Rev Immunol* **11**: 613-35.
- Zeuner, R. A., Ishii, K. J., Lizak, M. J., Gursel, I., Yamada, H., Klinman, D. M. and Verthelyi, D. (2002). "Reduction of CpG-induced arthritis by suppressive oligodeoxynucleotides." *Arthritis Rheum* **46**(8): 2219-24.
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F. and Sprent, J. (1998). "Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15." *Immunity* **8**(5): 591-9.
- Zhao, Q., Waldschmidt, T., Fisher, E., Herrera, C. J. and Krieg, A. M. (1994). "Stage-specific oligonucleotide uptake in murine bone marrow B-cell precursors." *Blood* **84**(11): 3660-6.
- Zhu, F. G., Reich, C. F. and Pisetsky, D. S. (2001). "The role of the macrophage scavenger receptor in immune stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides." *Immunology* **103**(2): 226-34.
- Zimmermann, S., Egeter, O., Hausmann, S., Lipford, G. B., Rocken, M., Wagner, H. and Heeg, K. (1998). "CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis." *J Immunol* **160**(8): 3627-30.
- Zippelius, A., Pittet, M. J., Batard, P., Rufer, N., de Smedt, M., Guillaume, P., Ellefsen, K., Valmori, D., Lienard, D., Plum, J., MacDonald, H. R., Speiser, D. E., Cerottini, J. C. and Romero, P. (2002). "Thymic selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans." *J Exp Med* **195**(4): 485-94.

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

ADCC	Antikörper-vermittelte zellgebundene Zytotoxizität
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CFSE	5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CG	Cytosin-Guanin
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
cpm	Counts per minute
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK 1/ 2	Extra-cellular signal-regulated kinase 1/ 2
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
GMCSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HEV	Hohe endotheliale Venolen
HSA	Humanes Serum-Albumin
I κ B α	Inhibitor of NF- κ B α
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
IPC	Interferon-produzierende Zelle
IPP	Isopentenyl-Pyrophosphat
IRAK 1/ 4	IL-1R-assozierte Kinase 1/ 4
IRF3	IFN regulatory factor 3
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KIR	Killer-inhibitory receptor
LAM	Lipoarabinomannan
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MALP-2	Macrophage-activating lipopeptide 2
MDC	Macrophage-derived chemokine
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
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 α
mRNA	Messenger RNA
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NF- κ B	Nuclear factor kappa B

NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Mononukleäre Zellen der peripheren Blutes
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PRR	Pattern-recognition-Rezeptor
PTZ	Plasmazytoide T-Zelle
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard error of mean
SLAM	Signaling lymphocytic activation molecule
SR-A	Scavenger-Rezeptor des Typs A
TARC	Thymus- and activation-regulated chemokine
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tetramere	Tetramere MHC-I-Komplexe
TH	T-Helper
TIR	Toll/ IL-1R-Domäne
TIRAP	TIR domain containing adapter protein
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TOPRO-3	To-Pro-3-Iodid
TRAF 6	TNFR-assoziierter Faktor 6
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN- β
TZR	T-Zellrezeptor

Danksagung

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

Ich bedanke mich auch besonders bei Prof. Dr. Gunther Hartmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die kontinuierliche Mitbetreuung meiner Arbeit. Seine Begeisterung für die Wissenschaft hat mich sehr stark motiviert. Ich danke Prof. Dr. Veit Hornung für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, seiner unermüdlichen Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung. Sein stets offenes Ohr für eigene Ideen, und die vielen Stunden zusammen im Labor werden stets in meiner Erinnerung bleiben. Bei Frau Dr. Anja Sarris möchte ich mich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und mein Projekt sowie die Hilfestellung bedanken. Mit sehr großem Engagement und Interesse hat sie meine Arbeit unterstützt.

Frau Rosemarie Kiefl danke ich für die Einführung in experimentelle Techniken und ihre hilfreiche Unterstützung im Labor. Weiterhin möchte ich mich bei allen anderen Doktoranden der Abteilung, insbesondere Dr. Julia Battiany, Dr. Moritz Wagner, Dr. Veronika Jackl und Dr. Katharina Schad für die sehr gute Zusammenarbeit, ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bedanken. Außerdem möchte ich mich auch noch bei meiner Frau Vera, meiner Schwester Christine, sowie Herrn Oliver Hoffmann für die kontinuierliche Unterstützung bei der Erstellung und Formatierung dieser Arbeit bedanken.