

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**CpG-DNA fördert die Bildung von multinukleären Riesenzellen mit
Resistenz gegen intrazelluläre Leishmanieninfektion**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Carmen Maria Bock

aus Vohenstrauß

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Diebold
Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

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

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

Tag der mündlichen
Prüfung: 23.07.2004

1.	Einleitung	1
1.1	Fragestellung	1
1.2	CpG-Oligonukleotide.....	1
1.2.1	Definition und Struktur von CpG-Oligonukleotiden	1
1.2.2	Wirkung von CpG-Oligonukleotiden auf das Immunsystem.....	3
1.2.3	Toll-like Rezeptoren.....	7
1.2.4	Klinische Relevanz von CpG-Oligonukleotiden	9
1.3	Differenzierungswege von Monozyten	10
1.4	Multinukleäre Riesenzellen.....	11
1.5	Leishmaniose.....	13
1.5.1	Lebenszyklus von Leishmanien.....	13
1.5.2	Pathologie.....	15
1.5.3	Verlaufsformen der Leishmaniose	17
1.5.4	Diagnostik und Therapie.....	19
1.5.5	Epidemiologie	20
1.6	Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit.....	21
2.	Material und Methoden.....	22
2.1	Präparation der Zellen und Zellkultur	22
2.2	Oligonukleotide	25
2.3	Morphologie	26

2.4	Oberflächenmarker	28
2.4.1	Durchflusszytometrie	28
2.4.2	Fluoreszenzmikroskopie	29
2.5	Phagozytose	30
2.6	Intrazelluläre Infektion mit Leishmania major	31
2.6.1	Kultur und Isolierung von Leishmania major.....	31
2.6.2	Kokultorexperimente von Monozyten mit Leishmanien.....	32
2.7	Statistische Analyse	33
3.	Ergebnisse	34
3.1	Etablierung eines Protokolls zur Generierung von multinukleären Riesenzellen	34
3.1.1	Das CpG-Oligonukleotid 2006 fördert die Bildung von multinukleären Riesenzellen aus Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ	34
3.1.2	Die CpG-Oligonukleotid-induzierte Bildung von multinukleären Riesenzellen ist abhängig von der Konzentration des Oligonukleotids..	39
3.1.3	Einfluss der Isolationsmethode auf die Generierung von multinukleären Riesenzellen	41
3.2	Die Rolle von Interferon-α bei der Bildung von multinukleären Riesenzellen	43
3.3	Eigenschaften von multinukleären Riesenzellen und Monozyten auf dem Differenzierungsweg zu multinukleären Riesenzellen im Hinblick auf Abwehr intrazellulärer Infektionen	47
3.3.1	Monozyten im Differenzierungsprozess zu multinukleären Riesenzellen exprimieren kostimulatorische und antigenpräsentierende Moleküle und haben eine verminderte CD14-Expression	47

3.3.2 Makrophagen, die phagozytiert haben, bewahren ihre Fähigkeit zur Fusion	49
3.3.3 Multinukleäre Riesenzellen exprimieren MHC I und MHC II	52
3.3.4 Multinukleäre Riesenzellen begrenzen intrazelluläre Infektionen mit Leishmania major	52
4. Diskussion	56
4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde.....	56
4.2 Bewertung der Ergebnisse	57
4.2.1 Etablierung eines Protokolls zur Generierung von multinukleären Riesenzellen	57
4.2.2 Die Rolle von Interferon- α in der Induktion von multinukleären Riesenzellen	61
4.2.3 Eigenschaften der multinukleären Riesenzellen hinsichtlich intrazellulärer Infektionen	64
4.3 Klinische Relevanz und Ausblick.....	67
5. Zusammenfassung	69
6. Literatur.....	70
Verzeichnis der Abkürzungen	82
Veröffentlichungen.....	85
Danksagung.....	86
Curriculum vitae	87

1. Einleitung

1.1 Fragestellung

Es ist bekannt, dass Monozyten unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, multinukleäre Riesenzellen zu bilden. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob immunstimulatorische CpG-DNA einen Einfluss auf die Bildung dieser Zellen und deren funktionellen Eigenschaften besitzt.

Multinukleäre Riesenzellen spielen *in vivo* eine Rolle in der Abwehr intrazellulärer Infektionen.

1.2 CpG-Oligonukleotide

1.2.1 Definition und Struktur von CpG-Oligonukleotiden

Bereits 1893 entdeckte William Coley, dass Injektionen von bakteriellen Lysaten (*Coley's toxin*) in Tumorgewebe zur Remission von Sarkomen führen können [Coley 1893]. Erst Ende des 20. Jahrhunderts wurde diese erste Idee einer Immuntherapie wieder aufgegriffen. So wird zum Beispiel zur Therapie des Harnblasenkarzinoms ein Lysat von Tuberkulosebakterien, *Bacillus Calmette Guérin* (BCG), lokal injiziert. Tokunaga et al. fanden bei der Auftrennung von BCG in seine Bestandteile, dass die Fraktion der Desoxyribonukleinsäure (DNA) die höchste antitumorale Wirkung zeigte [Tokunaga 1984]. Auch im murinen System wurde die immunmodulatorische Wirkung bakterieller DNA gefunden; die DNA von Vertebraten löste keine Immunantwort aus [Yamamoto 1992]. Kurze Zeit später ordneten Yamamoto et al. diese Wirkung bestimmten Basensequenzen - später CpG-Motive genannt - in der bakteriellen DNA zu. Außerdem gelang die Imitierung dieser Wirkung durch synthetische Oligodesoxynukleotide (ODN, kurz: Oligonukleotide) [Yamamoto 1994]. Andere Gruppen fanden eine stimulierende Wirkung auf B-Zellen bei Oligonukleotiden, die als Negativkontrollen bei Antisense-Versuchen eingesetzt wurden. Auch

diese ODN enthielten CpG-Motive [Krieg 1995]. CpG-Motive sind unmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide mit bestimmten flankierenden Basensequenzen [Krieg 1995]. Dabei steht „p“ für eine Phosphatbindung zwischen den beiden Basen. Synthetische Oligonukleotide, die CpG-Motive enthalten, werden als CpG-Oligodesoxynukleotide (kurz CpG-Oligonukleotide, CpG-ODN) bezeichnet.

Bakterielle und virale DNA unterscheidet sich von der eukaryontischen DNA von Wirbeltieren durch ihren Gehalt an CpG-Motiven. Die Häufigkeit von Cytidin-Guanosin-Dinukleotiden in bakterieller DNA entspricht einer statistischen Verteilung: eines von 16 Dinukleotiden ist ein CG-Dinukleotid. Bei Wirbeltieren hingegen sind CG-Dinukleotide statistisch unterrepräsentiert, nämlich nur eines von 60 Dinukleotiden (Tab. 1) [Karlin 1994]. Das Cytidin ist in 80% der CG-Dinukleotide im Wirbeltiergenom methyliert. Im bakteriellen Genom ist Cytidin hingegen meist unmethyliert. Methylierung des Cytosins blockiert die immunstimulatorische Wirkung von bakterieller DNA oder CpG-Oligonukleotiden [Stacey 1996]. Bakterielle DNA enthält also etwa zwanzigmal mehr unmethylierte CpG-Motive als Wirbeltier-DNA. Diese Unterschiede ermöglichten es dem Immunsystem von Vertebraten, im Verlauf der Evolution einen Erkennungsmechanismus für potenzielle Krankheitserreger anhand ihrer DNA-Struktur zu entwickeln [Hoffmann 1999].

Übersicht zum Aufbau von CpG-DNA

	CG-Dinukleotide	Methylierung am Cytidin
Wirbeltier-DNA	1 von 60 Dinukleotiden	ja
Bakterielle DNA	1 von 16 Dinukleotiden	nein
CpG-Oligonukleotid	vorhanden (CpG-Motive)	nein

Tab. I: Unterschiede in der Struktur von eukaryontischer und prokaryontischer CpG-DNA
[Rothenfusser 2001b]

Unmodifizierte Oligonukleotide werden durch Nukleasen rasch abgebaut. Phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide hingegen sind nukleaseresistent und somit für die Anwendung in vivo geeignet. Dabei wird ein nicht an der Bindung beteiligtes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom ersetzt. Diese Modifikation hat eine immunstimulatorische Eigenkomponente [Hartmann 1996].

1.2.2 Wirkung von CpG-Oligonukleotiden auf das Immunsystem

Das angeborene Immunsystem kann Pathogene anhand bestimmter molekularer Muster rasch erkennen (*pattern recognition*) und reagiert darauf mit einem charakteristischen Aktivierungsmuster von Immunzellen. Solche Muster sind zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS) oder eben DNA mit CpG-Motiven (CpG-DNA). Synthetische Oligonukleotide mit CpG-Motiven imitieren die Anwesenheit von mikrobieller DNA [Krieg 2002] und vermitteln der Zelle ein Gefahrensignal (Abb. I).

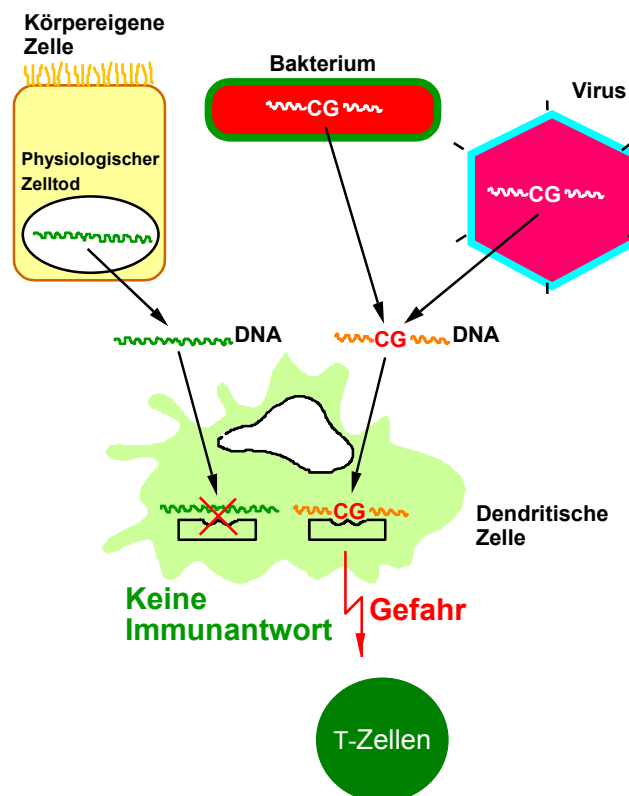


Abb. I: Erkennung von CpG-DNA durch dendritische Zellen
[Rothenfusser 2001b]

Ein direkter Effekt von CpG-ODN ist bisher nur auf B-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) nachgewiesen worden. Eine direkte Wirkung auf Monozyten, Makrophagen und myeloide dendritische Zellen (MDC) ist zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung. CpG-ODN haben auf natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und T-Zellen eine indirekte Wirkung über Zytokinsynthese anderer Zelltypen.

CpG-DNA stimuliert in PDC die Hochregulierung von CD80, CD86, MHC II und ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1). Anhand der Aktivierung von PDC wurden in unserer und in einer anderen Arbeitsgruppe zwei Klassen von

CpG–Oligonukleotiden definiert [Krug 2001a; Gursel 2002]. CpG-Oligonukleotide vom Typ A (CpG-A) induzieren in PDC die Synthese von Typ I-Interferon (Typ I-IFN, Interferon- α und Interferon- β), das NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen aktiviert und auf Monozyten und MDC kostimulatorische Moleküle hochreguliert [Krug 2001a]. Typ A-ODN sind charakterisiert durch eine palindromische Struktur. Das CpG-Motiv wird flankiert von poly-G-Sequenzen, die G-Tetraden bilden. Diese G-Tetraden binden an Scavengerrezeptoren und werden dadurch in die Zelle aufgenommen. Ein Vertreter dieser Gruppe im humanen System ist CpG-ODN 2216.

CpG-Oligonukleotide vom Typ B (CpG-B) mit dem Hauptvertreter CpG-ODN 2006 stimulieren in PDC in Kombination mit dem CD40-Liganden (CD40L) die Synthese von Interleukin-12 und fördern somit eine Th1-gerichtete antigenspezifische Immunantwort [Hartmann und Krieg 2000; Hartmann 2000]. Diese Art der Immunantwort entsteht vornehmlich bei intrazellulären bakteriellen Infektionen [Krieg 2000], während die Interferon- α -basierte Immunantwort eher bei viralen Infektionen induziert wird [Krug 2001a].

B-Zellen gehören zum spezifischen Immunsystem und werden durch CpG-DNA direkt zu Proliferation, Produktion von antigenpräsentierenden Molekülen, Immunglobulinen (Ig) und Zytokinen (Interleukin-6, Interleukin-10) angeregt [Hartmann und Krieg 2000; Krieg 2002].

CpG-Oligonukleotide wirken also direkt auf das angeborene Immunsystem. Durch ihre Effekte greifen sie auch in das erworbene Immunsystem ein.

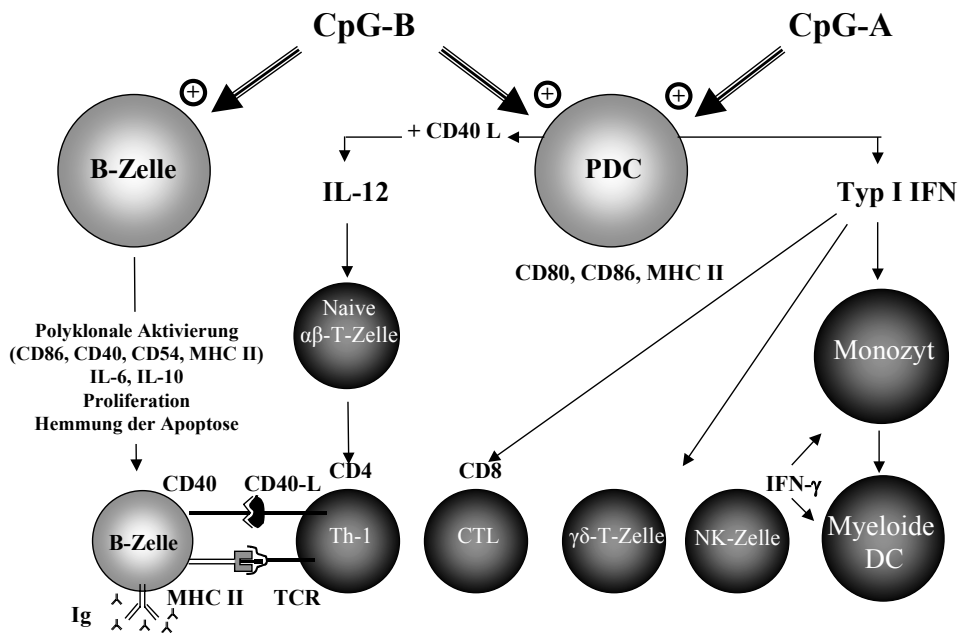


Abb. II: Zusammenfassung der Effekte von CpG-ODN auf Immunzellen

Bisher ist ein direkter Effekt von CpG-ODN vom Typ B auf B-Zellen und PDC gesichert. CpG-ODN vom Typ A stimulieren PDC in direkter Weise. Effekte von CpG-ODN auf andere Zelltypen sind wahrscheinlich indirekt vermittelt.

Die Wirkung von CpG-Oligonukleotiden im murinen Tiermodell ist eingehend untersucht [Wagner 1999]. Jedoch weisen die im murinen System aktiven CpG-Oligonukleotide im humanen System nur eine schwache Wirkung auf. Es wurden potente humane CpG-Motive identifiziert [Hartmann und Krieg 2000] und zur Verwendung im humanen System in vitro und in vivo weiterentwickelt [Hartmann 2000].

1.2.3 Toll-like Rezeptoren

Die Erkennung molekularer mikrobieller Muster erfolgt durch transmembranäre Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, den sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR). *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) sind solche PRR, die erstmals bei *Drosophila* entdeckt wurden, wo sie eine Antwort des angeborenen Immunsystems induzieren können. Seit der Identifizierung eines humanen Homologs des *Drosophila*-Toll-Proteins 1997 sind weitere Rezeptoren der humanen TLR-Familie entdeckt worden, von denen jeder Vertreter jeweils charakteristische molekulare Muster (Lipopolysaccharide, Lipoproteine, Flagellin und Peptidoglykane von Bakterien, Zymosan von *Candida* und doppelsträngige Ribonukleinsäure von Viren) erkennt [Aderem und Ulevitch 2000; Akira 2001; Alexopoulou 2001; Hayashi 2001]. Mikrobielle DNA und CpG-Oligonukleotide werden über den *toll-like*-Rezeptor 9 erkannt [Hemmi 2000; Bauer 2001; Krug 2001b; Takeshita 2001; Hemmi 2003]. Dazu muss die CpG-DNA in die Zelle aufgenommen werden, da TLR-9 im Gegensatz zu anderen *toll-like*-Rezeptoren nicht membranständig ist, sondern sich in Endolysosomen befindet. Immobilisierung der CpG-DNA hemmt die immunmodulatorische Wirkung [Manzel und Macfarlane 1999]. Zur Bindung von CpG-DNA an TLR-9 im Endolysosom ist die Ansäuerung des Zellkompartiments nötig. Blockierung der Azidifizierung durch Chloroquin blockiert den CpG-Effekt [Macfarlane und Manzel 1998].

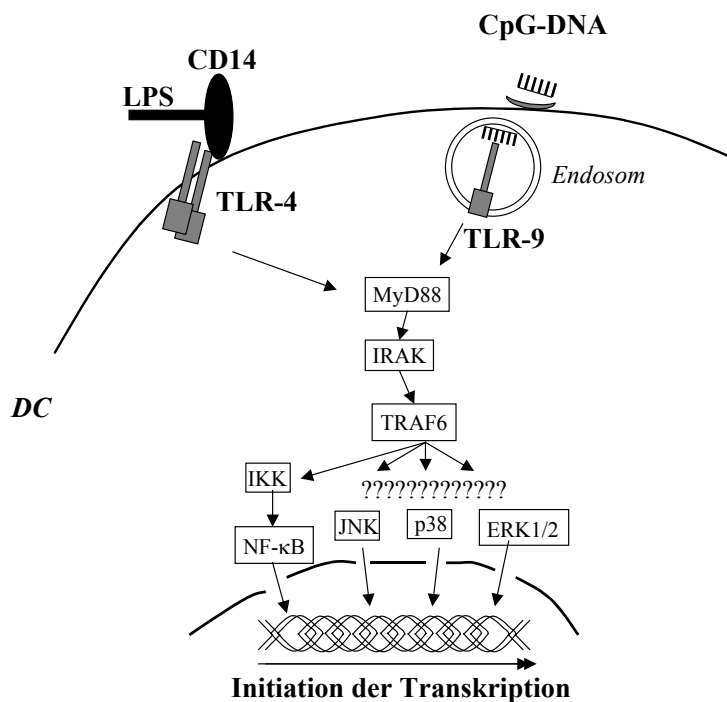


Abb. III: Signaltransduktionsweg von CpG-ODN über TLR-9

CpG-DNA wird sequenzunabhängig in Endosomen aufgenommen. Nach Azidifizierung des Endosoms bindet CpG-DNA an den *toll-like* Rezeptor 9. TLR-9 hat eine intrazelluläre Domäne, die mit derjenigen des Interleukin-1-Rezeptors homolog ist. Sie bindet an eine homologe Domäne des Adapterproteins MyD88, die mit der Serinkinase IRAK interagiert. IRAK wiederum interagiert mit dem Adapterprotein TRAF6. Dieses aktiviert über verschiedene Kinasen Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie und NF-κB, die daraufhin die Transkription starten. Der Signaltransduktionsweg von Lipopolysacchariden verläuft nach Bindung an den Rezeptor CD14 über die Aktivierung des TLR-4 [Aderem 2000; Aderem und Ulevitch 2000; Krieg und Wagner 2000]. Die Abbildung wurde zur Verfügung gestellt von PD Dr. Hartmann.

TLR-9 kommt auf humanen plasmazytoiden dendritischen Zellen und B-Zellen vor. T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten exprimieren geringe Mengen an TLR-9 [Hornung 2002]. In Mäusen finden sich TLR-9 auch auf Monozyten und Makrophagen in hohem Ausmaß. Dadurch können die unterschiedlichen Aktivierungsmuster von humanen und murinen Immunzellen erklärt werden. Allerdings scheint auch eine Kooperation von verschiedenen TLR zur Erkennung von Pathogenen und Modulation der darauffolgenden Immunantwort möglich zu sein [Hornung 2002].

1.2.4 Klinische Relevanz von CpG-Oligonukleotiden

Als Immuntherapeutika erscheinen CpG-Oligonukleotide vielversprechend, da sie anders als einzelne Zytokine wie Interferon- α oder Interleukin-1 eine koordinierte Immunantwort induzieren. Durch Aktivierung antigenpräsentierender Zellen und Erhöhung der Antikörperproduktion wirken CpG-Oligonukleotide im murinen Tiermodell [Chu 1997; Lipford 1997a; Roman 1997; Weiner 1997; Brazolot Millan 1998; Davis 1998; Liu 1998; Moldoveanu 1998; Stacey und Blackwell 1999; Freidag 2000; Krieg und Davis 2001; McCluskie 2001] und in Primaten [Jones 1999; Davis 2000; Hartmann 2000; Verthelyi 2002] als Impfadjuvanzien. In einer klinischen Studie wurde ein CpG-Oligonukleotid als Adjuvans bei der Hepatitis B-Impfung untersucht. Dabei wiesen 87 Prozent der mit CpG-ODN-Adjuvans behandelten Probanden vier Wochen nach der ersten Impfung spezifische Antikörper in seroprotektiv ausreichender Menge auf. Im Gegensatz dazu wiesen 20 Prozent der Probanden der Kontrollgruppe, die mit einem herkömmlichen Adjuvans behandelt wurden, einen ausreichenden Titer auf. Das getestete CpG-ODN ist gut verträglich [Halperin 2003].

Eine therapeutische Vakzinierung wird auch bei der Immuntherapie von Tumoren erprobt. CpG-Oligonukleotide können als Adjuvanzien bei der Immunisierung gegen tumorspezifische Antigene eingesetzt werden [Weiner 1997; Liu 1998; Brunner 2000]. Außerdem werden CpG-Oligonukleotide für die Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen in vitro im Rahmen von Tumorstoffen genutzt. Studien mit Tiermodellen zeigen, dass CpG-Oligonukleotide die Wirksamkeit von therapeutischen Antikörpern (z.B. Rituximab = Anti-CD20-mAb) durch die Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen verstärkt.

CpG-Oligonukleotide schützen Mäuse und Primaten durch Th1-gerichtete Aktivierung des Immunsystems vor Infektionen mit intrazellulären Pathogenen

wie Leishmanien und Listerien [Lipford 1997b; Krieg 1998; Zimmermann 1998; Elkins 1999; Klinman 1999; Oxenius 1999; Walker 1999; Corral und Petray 2000; Freidag 2000; Klinman 2000; Weighardt 2000; Gramzinski 2001; Gursel 2001; Juffermans 2002]. Im Tiermodell zeigen sie bei allergischen Erkrankungen durch Zurückdrängen der überschießenden Th2-Antwort therapeutische Wirksamkeit.

Derzeit werden CpG-Oligonukleotide zur Therapie von Tumorerkrankungen, Infektionskrankheiten und allergischen Erkrankungen wie Bronchialasthma klinisch geprüft. Es laufen fünf Phase I/II-Studien mit CpG-ODN als Therapeutikum von rezidivierendem Non-Hodgkin-Lymphom, malignem Melanom, Basalzellkarzinom, Nierenzellkarzinom und Mammakarzinom.

1.3 Differenzierungswege von Monozyten

Das mononukleäre phagozytäre System vermittelt verschiedene immunologische Abwehrmechanismen. Abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu können Monozyten verschiedene Differenzierungswege einschlagen. So kann die für die jeweiligen Erfordernisse richtige Immunantwort induziert werden.

Monozyten können sich in vivo entweder zu antigenpräsentierenden dendritischen Zellen differenzieren oder zu sogenannten *Scavenger-Monozyten*. Die Regulation ist dabei noch weitgehend ungeklärt. In vitro differenzieren sich Monozyten in Gegenwart von GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor) zu Makrophagen [Eischen 1991; Lopez 1993]. Die Aktivierung von ausdifferenzierten Makrophagen mit Interferon- γ oder bakteriellen Lipopolysacchariden führt zu aktivierten Killermakrophagen (*activated killer macrophages*, MAK), die in verschiedenen Studien Tumorzellen töten konnten. MAK-Zellen werden in klinischen Studien in der Immuntherapie von Krebserkrankungen eingesetzt [Lopez 1996; Oberling 1997; Andreesen 1998; Bartholeyns 2000; Wallace 2000]. Die Kultivierung von

Monozyten mit GM-CSF und Interleukin-4 stellt eine Standardmethode zur Generierung von unreifen myeloiden dendritischen Zellen dar [Sallusto und Lanzavecchia 1994; Romani 1996; Hausser 1997; Zou 2000]. CpG-ODN 2006 fördert die Differenzierung aus Vorläuferzellen, Reifung, Überleben und stimulatorische Funktion von plasmazytoiden dendritischen Zellen. Dendritische Zellen, die aus Monozyten in der Gegenwart von GM-CSF und Interleukin-4 generiert wurden, werden durch CpG-ODN 2006 nicht zur Entwicklung und Reifung gefördert [Hartmann 1999; Bauer 2001]. Eine teilweise Aktivierung erfolgt durch CpG-ODN 2216-konditioniertes Medium, das Typ I-Interferon enthält [Krug 2003]. Monozyten, die mit GM-CSF und Typ I-Interferon kultiviert wurden, entwickeln einen DC-artigen Phänotyp [Paquette 1998; Santini 2000]. In unserer Arbeitsgruppe wurde ein weiterer Typ von dendritischen Zellen beschrieben, der aus Monozyten durch Kultur mit GM-CSF und CpG-ODN vom Typ B generiert werden kann. Dieser DC-Phänotyp induziert eine antivirale Immunantwort über Produktion von Interleukin-15, Rekrutierung von CD8-T-Zellen, produziert aber nur wenig Interleukin-12 und ist ein schlechter Induktor einer Th1-Antwort [Krug 2003].

In bestimmten Kulturbedingungen *in vitro* oder bei verschiedenen pathologischen Zuständen *in vivo* entstehen aus Monozyten multinukleäre Riesenzellen.

1.4 Multinukleäre Riesenzellen

Multinukleäre Riesenzellen (*multinucleated giant cells*, MGC) sind Zellen mit mehr als zehn Zellkernen innerhalb der Zellmembran [McNally und Anderson 1995; Byrd 1998]. Sie entstehen durch Fusion von Zellen der Monozyten-Makrophagen-Linie [Vignery 2000]. Multinukleäre Riesenzellen werden eingeteilt in Osteoklasten, Fremdkörperriesenzellen (*foreign body giant cells*) und multinukleäre Riesenzellen vom Langhans-Typ (LGC).

Multinukleäre Riesenzellen können aus Monozyten *in vitro* auf verschiedene Arten generiert werden, zum Beispiel durch Inkubation mit Zytokinen wie

GM-CSF, Interleukin-3, Interleukin-4, Interleukin-13, Interferon- γ , mit Lektinen, konditioniertem Medium von stimulierten Lymphozyten, monoklonalen Antikörpern gegen MHC II, mit bakteriellen Komponenten oder durch direkten Kontakt mit Mykobakterien [Gasser und Most 1999; Anderson 2000]. Als Ausgangszellen wurden dabei Monozyten aus peripherem Blut verschiedener Spezies, alveoläre Makrophagen oder verschiedene monozytäre Zelllinien, z.B. die murine Zelllinie RAW eingesetzt.

Osteoklasten entstehen in der Gegenwart von *receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand* (RANKL) in Kombination mit Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF) [Zou 2001]. Sie sind meist kleine multinukleäre Riesenzellen mit nur zwei bis sechs Zellkernen und sind am Knochenabbau beteiligt [Anderson 2000; Vignery 2000].

Fremdkörperriesenzellen sind charakterisiert durch eine große Anzahl von Nuklei, die innerhalb der Zellmembran unregelmäßig angeordnet sind. In vivo umgeben sie unverdauliche Partikel wie Asbest, Silikate oder Prothesen. Sie werden durch Zytokine induziert, die für eine Th2-Immunantwort charakteristisch sind, vor allem Interleukin-4 und Interleukin-13 [McNally und Anderson 1995; DeFife 1997; Anderson 2000].

Multinukleäre Riesenzellen vom Langhans-Typ haben eine relativ kleine Anzahl von Nuklei, die innerhalb der Zelle in einer hufeisenförmigen Anordnung liegen (Abb. I) [Langhans 1868; Anderson 2000]. In vivo kommen sie bei granulomatösen Erkrankungen wie Tuberkulose, Lepra, Schistosomiasis und rheumatoide Arthritis vor. In vitro entstehen sie in Th1-Milieus mit GM-CSF, Interferon- γ oder Interleukin-3 [Enelow 1992; Fais 1994; McNally und Anderson 1995; Byrd 1998; Mizuno 2001], bei intrazellulären Infektionen [Gasser und Most 1999] oder in der Gegenwart von bakteriellen Bestandteilen wie Muramyldipeptid [Mizuno 2001].

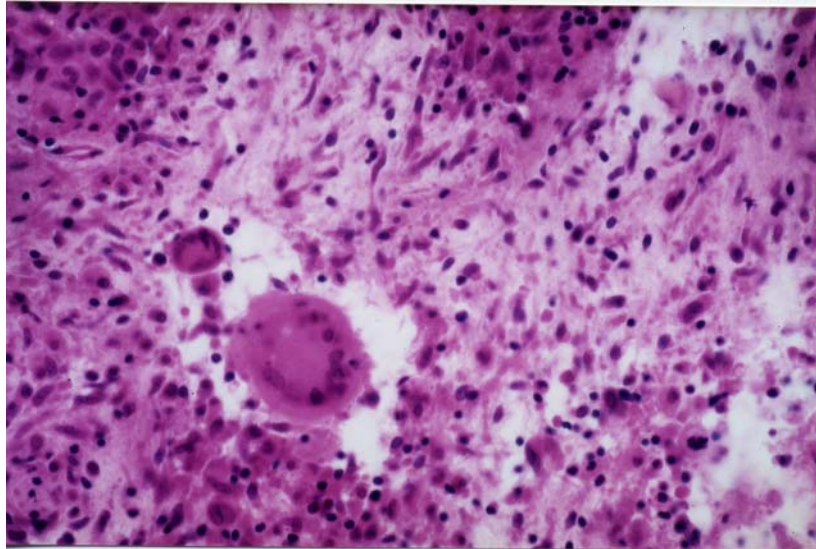


Abb. IV: Multinukleäre Riesenzellen vom Langhans-Typ aus der Gewebeprobe eines Tuberkulosepatienten der Medizinischen Klinik Innenstadt, Klinikum der LMU München
Abgebildet sind zwei multinukleäre Riesenzellen vom Langhans-Typ in einer mit May-Grünwald/Giemsa-Lösung angefärbten Knochenmarksprobe. Gut zu erkennen ist die charakteristische hufeisenförmige Anordnung der Nuklei (blauviolett angefärbt) innerhalb der Riesenzelle. Das Foto wurde von Prof. Dr. Löhrs, Pathologisches Institut, LMU München zur Verfügung gestellt.

1.5 Leishmaniose

Rund 500 000 Menschen infizieren sich jährlich mit der viszeralen Leishmaniose und bis zu 1,5 Millionen Menschen mit der kutanen Form der Leishmaniose.

1.5.1 Lebenszyklus von Leishmanien

Das infektiöse Agens *Leishmania* ist ein obligat intrazellulärer Parasit. Es existieren etwa 30 Spezies von Leishmanien, 21 davon können auf den Menschen übertragen werden.

Die Übertragung der Infektion erfolgt durch weiblichen Sandmücken (Gattungen *Phlebotomus* oder *Lutzomyia*). Sie kommen vorzugsweise an dunklen und feuchten Orten vor und sind vor allem abends und nachts aktiv.



Abb. V: *Phlebotomus perfiliewi*
[Banzer 2002]

Sticht die Mücke einen infizierten Wirt, gelangen die Leishmanien durch den Saugrüssel in den Darm des Insekts, wo sich die Parasiten vom amastigoten Stadium (unbegeißelt, 2 – 4 μm im Durchmesser) nach 5 bis 8 Tagen zu infektiösen, begeißelten Promastigoten entwickeln und in den Stechrüssel der Mücke zurückwandern. In diesem Stadium sind sie 1,5-3,5 μm groß und tragen ein 15-28 μm langes Flagellum. Bei der nächsten Blutmahlzeit gelangen die Erreger in den Blutkreislauf des Wirbeltiers, wo sie Monozyten, Makrophagen und Langerhanszellen infizieren. Hier verlieren sie ihre Geißel und entwickeln sich wieder zu Amastigoten, auch Leishman-Donovan-Körper genannt. Die Amastigote ist die intrazelluläre, replikationsfähige Erscheinungsform des Parasiten in den Phagosomen der Makrophagen von Vertebraten. In diesem Stadium ist der Parasit rund bis oval, 2-4 μm groß und trägt kein Flagellum [Herwaldt 1999].

Nager und Hunde stellen das hauptsächliche Reservoir dar; der Mensch wird als inzidenteller Wirt betrachtet. Die Spezies *Leishmania donovani* und *Leishmania tropica* können auch von Mensch zu Mensch übertragen werden. Weitere Übertragungswege sind Bluttransfusionen und infizierte Nadeln.

1.5.2 Pathologie

Leishmanien im Blutkreislauf von Wirbeltieren interagieren mit dem Komplementrezeptor CR3 (= CD11b/CD18) und werden durch Phagozytose in die Makrophagen internalisiert [Schonlau 2000]. CR3 erkennt Lipophosphoglykane auf den Leishmanien. Außerdem werden Leishmanien über den Scavengerrezeptor aufgenommen. In den Phagosomen der infizierten Zellen entwickeln sich die Parasiten zu unbegeißelten Amastigoten, die sich replizieren. Nach Ruptur oder Absterben der Zelle erfolgt eine weitere Infizierung anderer Zellen über Blut und Lymphe.

Der weitere Krankheitsverlauf hängt vom Immunstatus des Wirts und der Spezies der Leishmanien ab. Bei gutem Immunstatus werden die Parasiten in den Vesikeln infizierter Zellen durch aktivierte Makrophagen abgetötet. Das erfolgt durch radikalische Sauerstoffspezies und Stickoxide aus IFN- γ -stimulierten Zellen [Siegenthaler 1994]. Es werden Granulome gebildet und die Infektion beschränkt sich auf lokale Läsionen oder verläuft sogar frei von klinischen Symptomen. Interleukin-12 induziert eine zellvermittelte Immunantwort, indem es die Differenzierung naiver T-Zellen in Th1-Zellen fördert und die Produktion von IFN- γ in Th1-Zellen und natürlichen Killerzellen induziert. Dieser Mechanismus setzt sich erst spät in Bewegung. Sogar in selbstheilenden kutanen Läsionen kann sich der Parasit zunächst wochenlang vermehren, bevor die Läsionen zu heilen beginnen [Belkaid 1998]. Das LACK-Antigen auf *Leishmania major*, ein Leishmanienhomolog des Rezeptors für die aktivierte Proteinkinase-C , kann eine Th1-Antwort induzieren. Wenn die Infektion vom Immunsystem des Wirts bewältigt werden kann, verbleibt der Wirt mit einer lebenslangen Immunität gegen diese Leishmanien-Spezies [Kumar und Clark 1990].

Bei schlechtem Immunstatus, wie z.B. bei HIV-Patienten kommt es zur Ausbreitung der Infektion durch das retikuloendotheliale Netzwerk auf das gesamte mononukleäre phagozytäre System.

Im Mausmodell wird die Bedeutung des Th1/Th2 – Paradigmas gut deutlich: Bei infizierten Wildtyp-Mäusen vermittelt IFN- γ aus natürlichen Killerzellen und Th1-Zellen eine Resistenz gegen die Infektion durch Aktivierung von Makrophagen, die daraufhin intrazelluläre Leishmanien töten können. Steht hingegen wie bei BALB/c-Mäusen die Th2 – Antwort mit Interleukin-4 und Interleukin-10 im Vordergrund, entfällt die Makrophagenaktivierung und die Mäuse sind empfindlich für eine Leishmanieninfektion [Reed und Scott 1993; Janeway 1999].

Dieses Modell der experimentellen Leishmaniose hat große Bedeutung in der Erforschung von Immunantworten auf intrazelluläre Infektionen erlangt. Interleukin-12 wird zur Zeit als vielversprechendes Impfadjuvans untersucht. Interleukin-4 und Interleukin-10 hingegen werden mit einer Progression der Leishmanieninfektion assoziiert.

Der Krankheitsverlauf hängt stark ab von der Spezies der Leishmanien. Einige Spezies wie *Leishmania donovani* tragen auf ihrer Oberfläche Lipophosphoglykane, die die Proteinkinase C-abhängige Aktivierung von Makrophagen hemmen und somit die Immunabwehr des Wirts umgehen. Viszerotrophe Spezies migrieren mit der infizierten Zelle zu inneren retikuloendothelialen Organen. Zellen, die mit dermatotropen Spezies infiziert sind, bleiben in der Dermis.

1.5.3 Verlaufsformen der Leishmaniose

Die Leishmaniose wird eingeteilt in die viszerale, die kutane und die mukokutane Form, die von unterschiedlichen Spezies hervorgerufen werden (Tabelle II).

Viszerale Leishmaniose	L. donovani- Komplex: donoviani, infantum, chagasi L. tropica L. amazonensis
Kutane Leishmaniose der Alten Welt	L. tropica L. major L. aetiopica L. infantum L. donovani
Kutane Leishmaniose der Neuen Welt	L. brasiliensis L. mexicana – Komplex: mexicana, pifanoi, amazonensis, venezuelensis L. chagasi Subgenus Viannia
Mukokutane Leishmaniose	L. brasiliensis-Komplex: brasiliensis, peruviai, panamensis, guyanensis L. mexicana –Komplex L. amazonensis Subgenus Viannia

Tabelle II: Verlaufsformen der Leishmaniose und ihre Erreger
[Herwaldt 1999; Hepburn 2000; Banzer 2002]

Die **viszerale Leishmaniose**, auch Kala-Azar genannt, führt unbehandelt zu einer lebensgefährlichen Infektion des gesamten mononukleären phagozytären Systems. Dabei können Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark betroffen sein. Die Inkubationszeit kann mehrere Wochen bis Monate dauern. Im Anfangsstadium zeigen sich unspezifische Symptome wie Müdigkeit, leichtes Fieber oder zweimaliger Fieberschub pro Tag und Appetitverlust. Im weiteren Verlauf entwickeln sich eine ausgeprägte Hepatosplenomegalie, Anämie, Thrombozytopenie, Leukozytopenie, Hypergammaglobulinämie,

Hypoalbuminämie, Aszites, Knochenmarkshyperplasie, Hyperpigmentierung und schwere Kachexie. Unbehandelt sterben die meisten Patienten innerhalb von drei Jahren aufgrund pulmonaler oder gastrointestinaler Superinfektionen. Die viszerale Leishmaniose kann auch als HIV-assoziierte opportunistische Infektion auftreten. Leishmanien können einen Kofaktor in der Pathogenese einer HIV-Infektion darstellen, denn ein Oberflächenbestandteil von *L. donovani* induziert die Transkription des HI-Virus in CD4-Zellen [Bernier 1998].

Die **kutane Leishmaniose**, auch Bagdad- oder Aleppo-Beule genannt, hat eine durchschnittliche Inkubationszeit von einigen Wochen. Im Bereich des Stichs zeigt sich zunächst eine papulöse Hautveränderung, die entweder spontan abheilt oder ulzeriert (Abb. VI). Das meist 2 bis 4 cm große Ulkus beherbergt in der Regel im charakteristisch erhobenen Rand die Parasiten. In vielen Fällen werden diese Ulzera begleitet von Pruritis, Schmerz und einer Lymphanginitis. Die singulären oder multiplen Läsionen heilen nach Wochen bis Monaten ab und hinterlassen in Größe des Kraters atrophische Narben. Einige Spezies wie die *Leishmania tropica* neigen zu rezidivierenden Formen mit multiplen Läsionen mit zentral narbiger Abheilung. Peripher kommt es zu papulösen Entzündungen vor allem im Gesicht. Diese Ulzera persistieren oft jahrelang.



Abb. VI: Hautläsion eines Patienten mit kutaner Leishmaniose
[Banzer 2002]

Die **mukokutane Leishmaniose**, auch Espunida genannt, stellt eine metastasierende Komplikation der kutanen Leishmaniose dar. Sie wird oft erst einige Jahre nach Primärinfektion manifest. Dabei streuen Amastigoten aus der Haut über Blut und Lymphe in die Schleimhäute von Nase, Rachen, Kehlkopf und Lippen aus. Die Symptome sind rezidivierendes Nasenbluten, behinderte Nasenatmung, Zerstörung der Bindegewebsstrukturen und dadurch Zerstörung von Gaumen, Zunge, Larynx, Trachea, Nase und Lippen, außerdem Gesichtsverstümmelung, Sprach- und Schluckstörungen.

1.5.4 Diagnostik und Therapie

Die Diagnose einer Infektion mit Leishmanien wird hauptsächlich mittels Giemsa-Färbung von Geweben durchgeführt. Dabei werden die Amastigoten anhand ihrer Größe (2-4 μm Durchmesser), ihrer runden bis ovalen Form und der blauvioletten Anfärbung ihrer Organellen (Nukleus und Kinetoplast) im Lichtmikroskop identifiziert (Abb. VII). Kinetoplasten sind stabförmige mitochondriale Strukturen, die extranukleäre DNA enthalten.

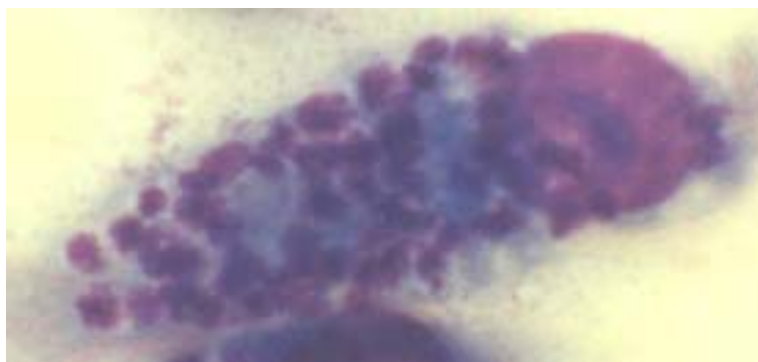


Abb. VII: Lichtmikroskopische Diagnostik

Infizierter Makrophage (rotviolett) mit Amastigoten, gefärbt mit Giemsa-Lösung. An ihrer Größe, Form und den angefärbten Organellen sind die Amastigoten (blauviolett) gut zu erkennen. Die Fotografie stammt aus einem Kokulturrexperiment im Rahmen dieser Arbeit.

Molekulare Methoden nutzen die charakteristische Struktur der DNA in den Kinetoplasten zur Diagnose. Eine genauere Identifizierung der Leishmanienspezies kann durch serologische Tests (ELISA,

Hämagglutinationstests) auf Antigene und Antikörper oder durch Isoenzymanalyse kultivierter Promastigoten durchgeführt werden. Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) gewinnt immer mehr an Bedeutung für die klinische Diagnostik.

Derzeit ist noch keine Vakzine zur Prophylaxe verfügbar, befindet sich aber in intensiven Studien. Dabei werden vor allem Kombinationsmöglichkeiten mit Zytokinen und Adjuvantien getestet [Modabber 1995; Machado-Pinto 2002].

Die Therapie ist abhängig von der Art der Krankheit und von der Leishmanien-Spezies. Mittel der Wahl ist fünfwertiges Antimon (Natriumstibogluconat oder N-Methylglucaminantimonat). Es wirkt in den meisten Fällen effektiv, muss aber parenteral verabreicht werden. Meist ist eine Therapie über mehrere Wochen hinweg nötig. Schwere unerwünschte Arzneimittelwirkungen begrenzen den Einsatz von Antimonpräparaten: EKG-Veränderungen, Erhöhung der Aminotransferasen, Müdigkeit und Schmerzen. Amphotericin B und Pentamidin sind aufgrund ihrer schweren renalen Nebenwirkungen Mittel der zweiten Wahl. Andere parenterale Therapeutika sind Paromomycin und Interferon- γ . Als orale Therapeutika kommen Ketokonazol, Itrakonazol und Dapson zur Verwendung, als lokale Therapeutika können Paromomycinsalbe und intraläsionale Antimonzubereitungen eingesetzt werden. Einsatzmöglichkeiten von Zytokinen in Kombination mit Chemotherapeutika werden zur Zeit in Studien getestet.

1.5.5 Epidemiologie

Leishmanieninfektionen kommen in Süd- und Mittelamerika, Südeuropa, Asien, Mittlerem Osten und Afrika vor. Die viszerale Leishmaniose ist vor allem in Bangladesh, Nordostindien, Nepal, Sudan und im Nordosten Brasiliens endemisch. Die kutane Leishmaniose kommt vor allem in Afghanistan, Algerien, Iran, Irak, Saudi-Arabien und Brasilien vor. Laut WHO sind 350 Millionen Menschen in den Endemiegebieten gefährdet.

1.6 Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit

Ein direkter Effekt von CpG-Oligonukleotiden auf Monozyten konnte im humanen System bislang nicht gezeigt werden. Der für die direkte Wirkung von CpG-Oligonukleotiden verantwortliche TLR-9 kommt auf Monozyten in geringer Menge vor. CpG-Oligonukleotide fördern nicht die Entwicklung und Reifung von dendritischen Zellen aus Monozyten in der Gegenwart von GM-CSF und IL-4 [Hartmann 1999; Bauer 2001]. Der Überstand von Zellkulturen, die mit CpG-Oligonukleotid 2216 stimuliert wurden und somit Typ I-Interferon enthält, führt zu teilweiser Aktivierung myeloider dendritischer Zellen, aber nicht zu ihrer Reifung.

In dieser Arbeit wurde der Effekt von CpG-Oligonukleotiden auf Monozyten untersucht, die mit GM-CSF und Interferon- γ kultiviert wurden. Dazu wurde ein Protokoll zur schnellen Herstellung von multinukleären Riesenzellen etabliert. Weiterhin wurde untersucht, ob sich die beiden verschiedenen Typen von CpG-ODN hinsichtlich der Wirkung auf die Bildung von multinukleären Riesenzellen unterscheiden und inwiefern Interferon- α als klassischer Vertreter der Immunantwort bei einer viralen Infektion an der MGC-Bildung beteiligt ist. Daraus sollen Unterschiede im Einfluss von CpG-ODN auf virale und intrazelluläre Infektionen abgeleitet werden. Die durch CpG induzierten MGC sollen hinsichtlich ihrer Eigenschaften zur Abwehr intrazellulärer Infektionen charakterisiert werden.

Als Ausgangspunkt dient die Hypothese, dass CpG-Oligonukleotide die Monozytendifferenzierung in der Gegenwart von GM-CSF und Interferon- γ beeinflussen können. Dabei dirigieren die unterschiedlichen Typen von CpG-Oligonukleotiden Monozyten in verschiedene Differenzierungswege, je nach der Art des Gefahrensignals, das sie nachahmen.

2. Material und Methoden

2.1 Präparation der Zellen und Zellkultur

Blut von gesunden nüchternen Spendern wurde mit 100 µl Heparin-Natrium (Braun, Melsungen) pro 10 ml Blut antikoaguliert. Alternativ wurden *Buffy coats* (Bayerisches Rotes Kreuz, München und Abteilung für Transfusionsmedizin, Universität Greifswald) verwendet. Als *Buffy coat* bezeichnet man die Leukozytenmanschette, die man beim Abzentrifugieren von Vollblut erhält. Diese besteht aus den plasmafreien zellulären Bestandteilen des Blutes mit einem reduzierten Gehalt an Erythrozyten. Die mononukleäre Zellfraktion (PBMC) wurde durch Dichtegradientenzentrifugation¹ (1000 g, 20°C, 15 Minuten) über Ficoll-Pacque (Biocoll, Biochrom KG Seromed, Berlin) in *Blue cap* – Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) gewonnen. Es folgten drei Waschschriffe in steriler physiologischer Kochsalzlösung (Baxter GmbH, Unterschleißheim) bei 4°C. Erythrozyten wurden durch Lyse (5 Minuten, 20°C) mit *Ortho-mune lysing reagent* (Ortho Diagnostic Systems GmbH, Neckargmünd) entfernt. Zur Negativselektion von Monozyten aus PBMC wurde die Depletion anderer Zelltypen mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung (MACS – Technik) angewendet. Dazu wurden mit *Monocyte isolation kit* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) CD3, CD7, CD19, CD45RA, CD56 und IgE auf der Zelloberfläche magnetisch markiert und in einer magnetischen Säule (VarioMacs, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) retiniert. Als MACS–Puffer wurde eine entgaste Lösung von Phosphatpuffer (PBS, *Dulbecco's phosphate-buffered saline*, PAA, Linz, Österreich) mit 0,02 % EDTA (Ethylendiamintetraacetat, Sigma, St.Louis, USA) und 2 % humanes Serum (humanes ABRh+ Serum, BioWhittaker, St. Louis, USA) verwendet. Die

¹ Zentrifugation einer Zellsuspension in Ficoll-Lösung (Dichte 1.077 g/ml) führt zur Aufkonzentrierung der PBMC an der Blutserum/Ficoll-Interphase. Granulozyten und Erythrozyten haben eine höhere Dichte und sedimentieren somit durch die Ficoll-Lösung zu Boden. Thrombozyten befinden sich aufgrund ihrer geringeren spezifischen Dichte im Serum oberhalb der Ficollschicht. PBMC können dann mit der Pipette aus der Interphase entnommen werden.

Reinheit der Monozytenpräparation betrug 85 bis 95 %, bestimmt durch durchflusszytometrische Messung von CD14.

In Vorversuchen wurden Monozyten durch Positivselektion von CD14-markierten Zellen mit Hilfe von magnetischen CD14-*MicroBeads* (magnetische Zuckerstrukturen mit anti-CD14-Antikörpern, Miltenyi, Bergisch Gladbach) isoliert. Die Reinheit in diesen Fällen betrug 80 bis 85 %.

Als dritte Isolierungsmethode wurde in Vorversuchen die Adhärenzmethode angewendet. Dabei wurden die PBMC mit RPMI-Medium (VLE RPMI 1640 Medium, Biochrom KG seromed, Berlin) mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS, HyClone, Logan, UT); 1.5 mM L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alle von Gibco BRL, Grand Island, New York)² und mit 2 % AB-Serum (ABRh+ Serum, BioWhittaker, St.Louis, USA) auf eine Konzentration von ca. 20 Millionen PBMC/ml eingestellt und suspendiert. Jeweils 10 ml der Suspension wurden in Kulturflaschen (600 ml, Greiner, Frickenhausen) verteilt, in denen 15 ml Medium vorgelegt waren. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ wurde der Überstand mit den nicht adhärenen Zellen abgenommen und verworfen. Dann wurde die adhärenente Zellschicht an der Plastikwand der Flasche mit 15 ml PBS bei Raumtemperatur durch sanftes Schütteln gewaschen, das PBS abgenommen und verworfen. Die so gewonnene adhärenente Monozytenfraktion wurde mit 25 ml Medium weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dabei lösen sich die Monozyten wieder von der Plastikoberfläche. Beim Dekantieren der Monozytensuspension wurden restliche, noch am Flaschenboden adhärenente Monozyten mit einem Zellschaber (Sarsted, Newton, NC) geerntet. Die so erhaltene Zellsuspension wurde bei 4°C und 300 g zehn Minuten lang zentrifugiert und das Zellpellet in Medium resuspendiert.

In einigen Ansätzen wurden aus PBMC die plasmazytoiden dendritischen Zellen durch magnetische Markierung des PDC-spezifischen

² Im folgenden „Medium“ genannt

Oberflächenmarkers BDCA-4 depletiert (*BDCA-4 cell isolation kit*, Miltenyi, Bergisch Gladbach). Anschließend wurde die PDC-freie Fraktion der PBMC wie oben beschrieben zur weiteren Monozytenisolierung eingesetzt. Der Gehalt an PDC wurde mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der CD123-positiven, HLA-DR-positiven und lineage-negativen Zellfraktion gemessen. Präparationen mit einem Gehalt von weniger als 0,02 % an PDC wurden als Fraktionen mit niedrigem PDC-Gehalt definiert, Präparationen mit mehr als 0,2 % an PDC als Fraktionen mit hohem PDC-Gehalt.

Die Viabilität der Zellen wurde durch Trypanblauausschluss³ lichtmikroskopisch bestimmt und ergab über 95 Prozent viable Zellen. Zellkonzentrationen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Monozyten wurden in Medium (VLE RPMI 1640 Medium, Biochrom KG seromed, Berlin) resuspendiert, das mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum FCS (HyClone, Logan, UT), 1.5 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt wurde (alle von Gibco BRL, Grand Island, New York). Alle Substanzen waren auf Endotoxin getestet. Die Monozyten wurden in Kulturplatten mit 48 Wells (je 800 ml Zellsuspension) oder 96 Wells (je 200 ml Zellsuspension) in einer Konzentration von 1 Million Zellen/ml mit verschiedenen Kombinationen von GM-CSF (800 U/ml, Leukomax 400, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg), Interferon- γ (1000 U/ml, *Recombinant human IFN- γ* , R&D Systems GmbH, Wiesbaden), Lipopolysaccharid (LPS, 1 ng/ml, aus *Salmonella typhimurium*, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) und Oligonukleotiden (6 µg/ml) bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank der Firma Heraeus (Hanau), bzw. Kendro (Hanau). Jeden zweiten Tag erfolgte ein Medienwechsel. Dabei wurden auch die Zytokine und Stimuli ersetzt.

Für einige Ansätze wurde eine Dreifachkombination von blockierenden Antikörpern gegen Interferon- α (*Polyclonal rabbit anti-human Interferon- α* ,

³ Im Gegensatz zu toten Zellen und Zellfragmenten nehmen lebende Zellen aufgrund ihrer intakten Zellmembranen den Farbstoff Trypanblau nicht auf.

5000 U/ml), Interferon- β (*Polyclonal rabbit anti-human Interferon- β* , 1000 U/ml) und gegen die Interferon- α -Rezeptor-Kette 2 (*Mouse anti-human interferon- α receptor chain 2 = CD118*, 20 μ g/ml; alle von PBL, New Brunswick, NJ) eingesetzt, abgekürzt anti-IFN- α / β /R. Weiterhin wurde ein blockierender monoklonaler Antikörper gegen Interleukin-12 eingesetzt (*Mouse anti-human IL-12 (p40/p70)*, Klon C8.6, 3 μ g/ml, BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland). Rekombinantes Interferon- α (PBL, New Brunswick, NJ) wurde in einer Konzentrationsreihe von 0,1 U/ml bis 1000 U/ml eingesetzt. Alle Arbeitsschritte unter Sterilbedingungen wurden unter einer Sterilwerkbank (LaminAir[®] HB 2448, Heraeus, München) durchgeführt.

2.2 Oligonukleotide

Die eingesetzten nukleaseresistenten phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotide wurden von Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, MA, USA) bezogen. Für diese Arbeit wurde ein im humanen System besonders potentes CpG-ODN gewählt, CpG-ODN 2006 (Sequenz : 5'-**TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT**-3')⁴ [Hartmann 2000]. In einigen Experimenten wurde CpG-ODN 2216 eingesetzt (Sequenz : 5'-GGg gga **cga tcg tcG** GGG Gg -3'; Großbuchstaben stellen eine Phosphothioatbindung rechts der Base dar, Kleinbuchstaben eine Phosphodiester-Bindung). Als Kontrolloligonukleotid wurde das poly-C-ODN 2017 mit einem vollständigen Phosphorothioat-Gerüst eingesetzt (Sequenz: 5'-CCC CCC CCC CCC CCC CCC CC-3') [Jahrsdorfer 2001]. Aufgrund von Befunden aus früheren Studien der Arbeitsgruppe wurden die ODN in einer Endkonzentration von 6 μ g/ml eingesetzt. In einem Ansatz wurde CpG-ODN 2006 in einer Konzentrationsreihe von 0,3 μ g/ml bis 6 μ g/ml eingesetzt. In den ODN-Präparationen war mit dem Limulus-Amoebocyten-Lysat Assay (LAL, unteres Detektionslimit 0.03 EU/ml; BioWhittaker, Walkersville, MD) kein LPS detektierbar.

⁴ C = Cytidin, G = Guanosin, T = Thymin, A = Adenosin

2.3 Morphologie

Die Morphologie der Zellen in Kultur wurde mikroskopisch analysiert. Dazu wurde ein Phasenkontrastmikroskop⁵ (Nikon Diaphot[®], Tokio, Japan) verwendet. In einem experimentellen Ansatz wurden die Zellkulturen täglich, in anderen Ansätzen nach drei, sieben und neun bzw. zehn Tagen mikroskopisch untersucht und die Anzahl der multinukleären Riesenzellen bestimmt. MGC wurden definiert als Zellen mit mehr als zehn Zellkernen innerhalb der Zellmembran. Die MGC wurden innerhalb eines Analysenfelds mit der Fläche 1,2 mm² gezählt. Das Analysenfeld wurde durch den Fotorahmen des Mikroskops bei einer zweihundertfachen Vergrößerung definiert. Dabei wurden bei jeder Probe drei verschiedene Analysenfelder des Kulturwells ausgezählt und der Mittelwert der drei Ergebnisse berechnet. Für eine detailliertere Analyse der Morphologie wurde in einigen Experimenten die Kultur zu den angegebenen Zeitpunkten abgebrochen. Die Zellen wurden im Kulturwell vier Minuten lang mit Methanol fixiert und mit May-Grünwald/Giemsa-Reagenz gefärbt (Merck Eurolab, Darmstadt). Dazu wurden die Kulturen fünf Minuten lang mit May-Grünwald-Reagenz überschichtet, zweimal mit gepuffertem entmineralisiertem Wasser gespült (Hämatologie-Puffertabletten pH 7,2; Merck, Darmstadt), fünfzehn Minuten lang mit 4,5 %iger Giemsa-Lösung überschichtet und schließlich mit ungepuffertem entmineralisiertem Wasser abgespült. In den gefärbten Zellkulturen wurde die Anzahl der MGC, der intrazellulären Nuklei und die Gesamtzahl der Zellkerne innerhalb eines Analysenfelds bestimmt. Daraus wurde nach folgender Formel der Fusionsindex (FI) bestimmt:

$$\text{FI [\%]} = \text{Anzahl der Nuklei innerhalb von MGC} / \text{Gesamtzahl der Nuklei} \times 100$$

Die Zellkulturen wurden in einigen Experimenten zu den angegebenen Zeitpunkten mit einer am Mikroskop installierten Kamera (Nikon, Tokio, Japan) fotografiert.

⁵ Wenn Licht durch ein optisch dichteres Medium (z.B. Plasmamembranen oder Zellkerne) tritt, wird es in seiner Ausbreitungsgeschwindigkeit gehemmt. Die dadurch entstehenden Phasenunterschiede zwischen den einzelnen elektromagnetischen Wellen werden durch Polarisationsfilter im Strahlengang in Helligkeitsdifferenzen umgewandelt. So können die Zellstrukturen kontrastreich dargestellt werden.

In einem Experiment wurde unter Verwendung von *Acid phosphatase kit* (Sigma Diagnostics, St.Louis, USA) ein Test auf tartratresistente saure Phosphatase (TRAP-Assay) durchgeführt. Das Enzym wird dabei indirekt nachgewiesen, indem es von einer phosphatierten Naphtholverbindung Phosphat abspaltet. Das freie Naphthol kann daraufhin an ein Diazoniumsalz koppeln und dadurch einen rotbraunen Farbstoff bilden. Aufgereinigte Monozyten wurden neun Tage lang mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 kultiviert. Dann wurden die Zellen im Well mit PBS gewaschen und 30 Sekunden lang mit 0,4 ml Citratlösung pro Well (18 mmol/L Zitronensäure, 9 mmol/L Natriumcitrat und 12 mmol/L Natriumchlorid; pH 3,6), 65 ml Aceton und 8 ml Formaldehydlösung 37 % fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung mit entmineralisiertem Wasser abgewaschen. Dann wurde pro Well 0,4 ml Reaktionslösung (125 μ l Diazoniumsalz GBC; 125 μ l Natriumnitrit; 11,25 ml entmineralisiertes Wasser; Naphthol-AS-BI-Phosphorsäure 0,125 ml; Acetatpuffer 0,5 ml; Tartratpuffer 0,25 ml) eingesetzt und eine Stunde lang bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde die Reaktionslösung mit entmineralisiertem Wasser abgewaschen und zwei Minuten lang mit Hematoxylinlösung (6 g/L Hematoxylin; 0,6 g/L Natriumjodat und 52,8 g/L Aluminiumsulfat) zur Stabilisierung überschichtet. Diese wurde mit Leitungswasser abgewaschen. Nach Trocknen an der Luft wurden die Wells mikroskopisch auf die charakteristische TRAP-Färbung untersucht. Einige Proben wurden zur Verdeutlichung der Morphologie bei einer 630fachen Vergrößerung mittels Immersionsöl untersucht.

2.4 Oberflächenmarker

2.4.1 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können Oberflächeneigenschaften von Zellen dargestellt und quantifiziert werden. Oberflächenantigene werden mit Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dann werden die Zellen durch eine Kapillare in einem Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander laminar durch einen Laserstrahl gesaugt. Verschiedene Eigenschaften der Zelloberfläche bewirken eine Streuung des Laserstrahls, die von einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht, FSC) und einer Linse im rechten Winkel zum Strahl (Seitwärtslicht, SSC) detektiert wird. Die Zellgröße bestimmt dabei die Streuung des Vorwärtsstreulichts; die Beschaffenheit der Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile bestimmen das Seitwärtsstreulicht. An dieser Stelle kann man bereits die interessierende Zellpopulation anhand von morphologischen Merkmalen identifizieren. Zellfragmente und tote Zellen erscheinen bei einem deutlich geringeren Vorwärtsstreulicht.

Der Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) an bestimmten Oberflächenstrukturen der Zelle wird durch den Laserstrahl zur Emission von Licht bestimmter Wellenlängen angeregt. Dieses Licht wird durch eine Linse gesammelt, durch Bandpassfilter in die einzelnen Wellenlängen getrennt und durch Detektoren in elektrische Signale umgewandelt und logarithmisch verstärkt. Die Intensität der Signale ist proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle. Es können bis zu vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden und somit an einer Zelle bis zu vier verschiedene Oberflächenstrukturen gleichzeitig ausgewertet werden.

Durch Negativselektion isolierte, nicht markierte Monozyten wurden am zweiten Tag der Kultur mit eiskaltem PBS geerntet und ausgewählte Oberflächenmarker wie beschrieben gefärbt [Hartmann 1998]. Es wurden Fluorescein-Isothiozyanat-, Phycoerythrin-, Peridinin-Chlorophyll-Protein- und

Allophycocyanid - gefärbte monoklonale Antikörper gegen CD80, CD86, CD14, IgG_{1κ} (Pharmingen, San Diego) und gegen HLA-DR, CD123 und IgG_{2a} (Becton Dickinson, San Diego CA) verwendet. Die Zellsuspensionen wurden auf ca. 500 000 bis 1 Million Zellen pro 100 µl Flüssigkeit eingestellt. Bei jeder Messung wurden mindestens 10 000 Zellen vermessen. Zur Aufnahme wurde ein FACS Calibur[®] Durchflusszytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) mit einem Argonlaser ($\lambda = 488 \text{ nm}$) und einem roten Diodenlaser ($\lambda = 635 \text{ nm}$) eingesetzt. Die Überlappung der Fluoreszenzspektren wurde durch Kompensierung korrigiert. Anhand von farbstoffmarkierten Isotyp-Kontrollen (verwendet wurden Anti-IgG_{1κ} und Anti-IgG_{2a}-Antikörper) können die Signale so eingestellt werden, dass die Fluoreszenz unspezifischer IgG-Strukturen herausgemittelt werden kann.

Die Analyse wurde in einem Lebendfenster durchgeführt (FSC, SSC >97 % der viablen Zellen). Die Daten wurden mit CellQuest[®]- Software (Becton Dickinson) analysiert. Die Ergebnisse wurden für Reinheitsbestimmungen als prozentuale Anteile der gemessenen Zellpopulation von der Gesamtzellzahl angegeben oder bei Vergleichsmessungen von Oberflächenmarkern als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI, *mean fluorescence intensity*), die sich aus dem arithmetischen Mittel der Fluoreszenzintensitäten aller im Analysenfenster befindlichen Ereignisse errechnet.

2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Bestimmung der Expression von Oberflächenmarkern auf MGC musste auf die Fluoreszenzmikroskopie zurückgegriffen werden, da MGC aufgrund ihrer Größe nicht im Durchflusszytometer vermessen werden können. Dabei werden Oberflächenmarker der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiozyanat (FITC) spezifisch angefärbt. Dieser Farbstoff wird durch monochromatisches Licht angeregt und emittiert daraufhin Licht einer

charakteristischen Wellenlänge, die mithilfe eines Fluoreszenzfilters im Mikroskop detektiert werden kann.

Monozytenpräparationen wurden nach fünf Tage langer Kultur mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 mit FITC-markierten Antikörpern gegen humanes HLA-A, B, C (MHC I) und HLA-DR, DP, DQ (MHC II) gefärbt (Pharmingen, San Diego, CA, USA). Die qualitative Analyse erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Diaphot[®], Fluoreszenzfilter 520 nm) in den Kulturwells. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte wie oben beschrieben mittels Fotografien.

2.5 Phagozytose

Zur Untersuchung der Phagozytosekapazität der Monozyten wurden zu Beginn der Kultur sterile blaue Latexbeads in einer Konzentration von 0,5 mg/ml zugegeben (*Deep blue dyed latex beads*, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim). Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurden die nicht phagozytierten Latexbeads mit Medium (37°C) abgewaschen. Die Kultur mit verschiedenen Kombinationen von GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 wurde wie angegeben weitergeführt. Die Phagozytosekapazität der Zellen wurde anhand der Akkumulierung von Latexbeads innerhalb der Zellen qualitativ mikroskopisch ermittelt und fotografisch dokumentiert.

In einem anderen experimentellen Ansatz wurden Monozyten vier Tage lang wie angegeben mit verschiedenen Kombinationen von GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 kultiviert. Am vierten Tag wurden Latexbeads wie oben beschrieben zugegeben und nach einer Inkubationszeit von drei Stunden abgewaschen. Nach einer weiteren Kultur von 24 Stunden wurde die Phagozytose qualitativ mikroskopisch analysiert.

2.6 Intrazelluläre Infektion mit *Leishmania major*

Die Experimente mit *Leishmania major* wurden von der Autorin in einem Labor mit Sicherheitsstufe B nach Biostoff-Verordnung am Institut für Dermatologie der Universität Mainz unter der Betreuung von Frau Dr. von Stebut durchgeführt. Die Materialien inklusive der Leishmanien wurden von Dr. von Stebut zur Verfügung gestellt.

2.6.1 Kultur und Isolierung von *Leishmania major*

Leishmania major Klon V1 (MHOM/IL80/Friedlin) wurde in *Complete medium* 199 [Sacks 1998] kultiviert, versetzt mit 20 % hitzeinaktiviertem FCS (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 2 mM L-Glutamin; 40 mM Hepes (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim); 0,1 mM Adenin (in 50 mM Hepes); 5 µg/ml Hemin (in 50 % Triethanolamin) und 1 µg/ml 6-Biotin (in 95%igem Ethanol). Die infektiösen metazyklischen Promastigoten von *Leishmania major* wurden aus stationären, fünf bis sechs Tage alten Kulturen durch Negativselektion mittels Erdnuss-Agglutinin (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) isoliert. Die isolierten Parasiten wurden mit humanem Serum opsonisiert. Der LPS-Gehalt der Parasitenpräparationen lag unter dem Detektionslimit (<0,1 Endotoxin U/ml; LAL-Test, Bio Whittaker, Walkersville, MD). Die Parasiten wurden in einer Stammkonzentration von 5 Millionen Parasiten pro ml eingesetzt [Belkaid 1998; Sacks 1998].

2.6.2 Kokulturrexperimente von Monozyten mit Leishmanien

Monozyten wurden wie oben beschrieben mit verschiedenen Kombinationen von GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 kultiviert. Nach sechs Tagen in Kultur wurden *Leishmania major* als metazyklische Promastigoten in einer Konzentration von fünf Organismen pro Zelle in die Kulturwells inokuliert. Nach vier Stunden Kokultur bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die nicht phagozytierten Parasiten mit Medium gewaschen. Die phagozytierten Promastigoten wandeln sich intrazellulär in Amastigoten (auch Leishman-Donovan-Körper genannt) um. Ein Teil der infizierten Kulturen wurde noch eine Stunde lang im Brutschrank inkubiert und dann mit *DiffQuick staining set* (Dade Behring AG, Duedingen, Schweiz) fixiert und gefärbt. Der zweite Teil der infizierten Kulturen wurde noch zwei Tage lang mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 wie oben beschrieben im Brutschrank inkubiert und dann gefärbt. In den gefärbten Proben wurde die Morphologie der Zellen und das Ausmaß der Infektion mit dem Mikroskop qualitativ analysiert und fotografisch dokumentiert. Die Parasiten sind dabei anhand ihrer Größe (2-4 μm im Durchmesser), ihrer runden bis ovalen Form und der blauvioletten Anfärbung von Nukleus und Kinetoplast gut zu erkennen (Abb. V). Ein Vergleichsfoto aus einer Publikation befindet sich im Anhang. Die infizierten Makrophagen und MGC, die mindestens einen Parasiten intrazellulär enthalten, wurden gezählt. Die Gesamtzahl der Makrophagen und MGC und die Zahl der intrazellulären Parasiten pro Makrophage und pro MGC wurden bestimmt. Dabei wurden für jede Probe die Makrophagen, MGC und intrazellulären Parasiten in drei verschiedenen Analysefeldern (definiert durch den Fotorahmen des Mikroskops bei 630facher Vergrößerung mit Immersionsöl) gezählt und das Mittel der drei Werte bestimmt. Die Infektionsrate berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Infektionsrate [\%]} = \text{Anzahl der infizierten Zellen} / \text{Gesamtzahl der Zellen} \times 100$$

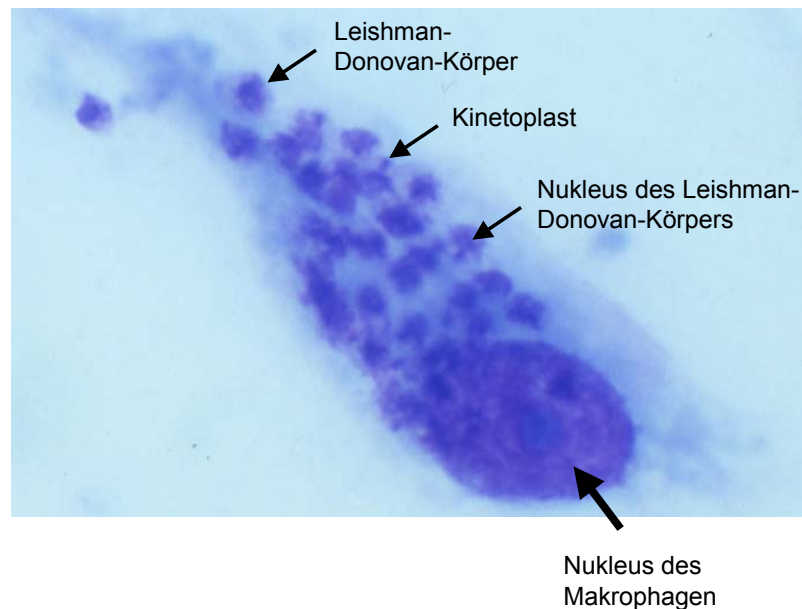


Abb. V: Infizierter Makrophage aus einem Kokulturrexperiment

Nach Anfärben mit *DiffQuick staining set* sind die Amastigoten (Leishman-Donovan-Körper) bei einer 630fachen Vergrößerung mit Immersionsöl im Lichtmikroskop an ihrer Größe, ihrer runden bis ovalen Form und der dunkelvioletten Anfärbung ihrer Organellen Nukleus und Kinetoplast gut zu erkennen.

2.7 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden als arithmetisches Mittel angegeben. Die Streuung wurde als Standardfehler des Mittels (SEM, *standard error of mean*) dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit dem gepaarten zweiseitigen Student-t-Test ermittelt. Für die Ergebnisse in Abbildung 9 wurde der ungepaarte zweiseitige Student-t-Test verwendet. Die Ergebnisse wurden ab $p < 0,05$ als signifikant erachtet. Die statistischen Analysen wurden mit der StatView 4.51 Software (Abacus Concepts Inc., Calabasas, CA, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Protokolls zur Generierung von multinukleären Riesenzellen

3.1.1 Das CpG-Oligonukleotid 2006 fördert die Bildung von multinukleären Riesenzellen aus Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ

Monozyten, die mit GM-CSF und Interferon- γ inkubiert werden, bilden multinukleäre Riesenzellen [Enelow 1992; Fais 1994; McNally und Anderson 1995; Byrd 1998; Mizuno 2001]. Frühere Studien der Arbeitsgruppe zeigten, dass Monozyten in PBMC nach Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 hochregulieren [Hartmann und Krieg 1999]. ICAM-1 ist beteiligt an der Fusion von Monozyten und an der Bildung von MGC [Fais 1994; Mizuno 2001]. Um den Einfluss von CpG-ODN auf die MGC-Bildung von Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ zu zeigen, wurden aufgereinigte humane Monozyten mit verschiedenen Kombinationen von GM-CSF, Interferon- γ , CpG-ODN 2006, CpG-ODN 2216, dem Poly-C-Kontrolloligonukleotid 2017 und LPS inkubiert. Am dritten Tag der Kultur mit GM-CSF oder mit GM-CSF und Interferon- γ zusammen war die Bildung von Zellclustern erkennbar. Die Zugabe von CpG-ODN 2006 zu GM-CSF und Interferon- γ zu Beginn der Kultur führte zur Bildung von MGC ab dem dritten Tag der Kultur (Abb. 1 A-D).

May-Grünwald/Giemsa-Färbung der Zellen zeigte, dass die entstandenen MGC die Charakteristika von multinukleären Riesenzellen vom Langhans-Typ aufweisen: mehr als zehn Zellkerne innerhalb der Zellmembran in einer hufeisenförmigen Anordnung (Abb.1F).

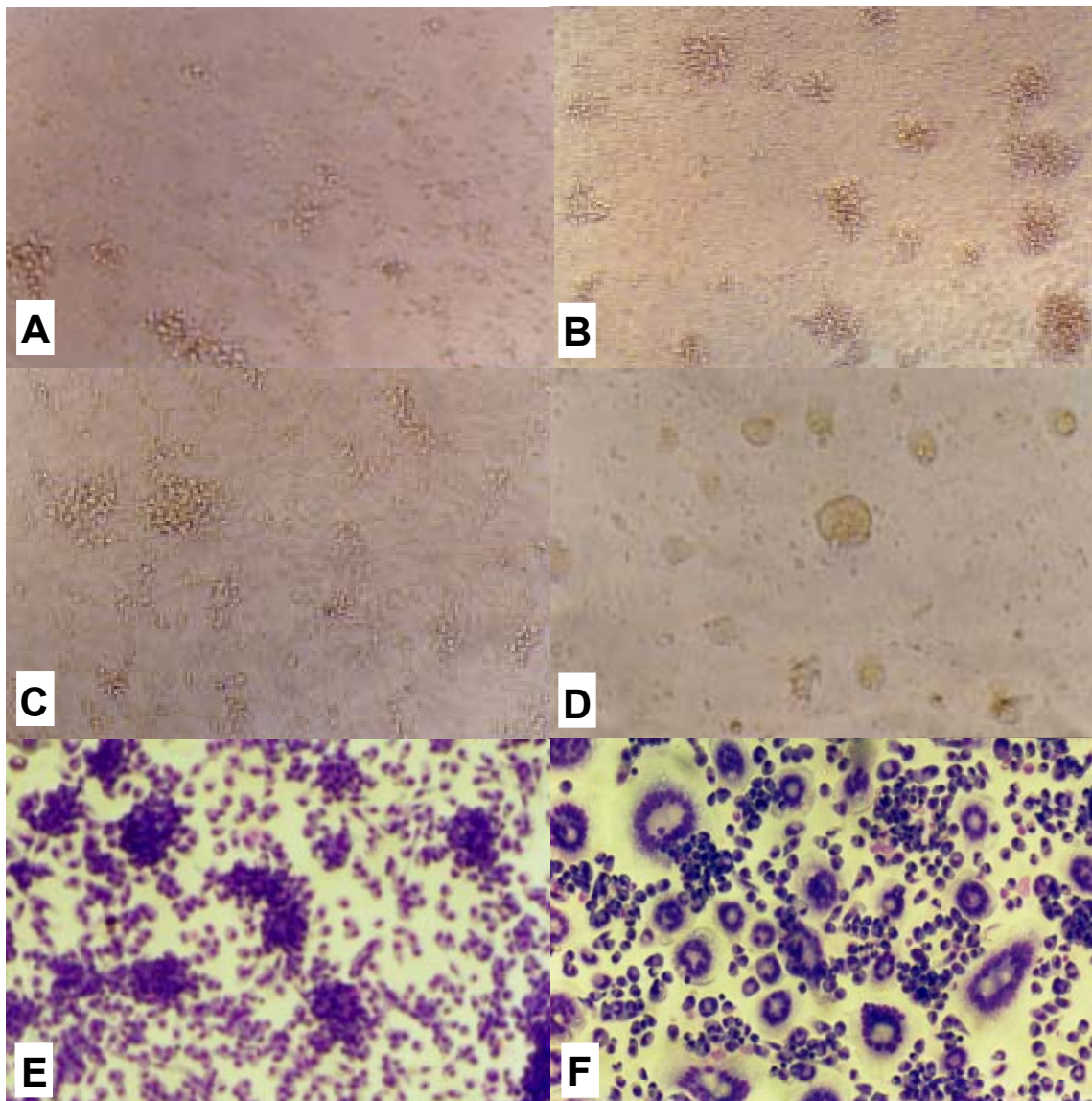


Abb. 1A-F: CpG-ODN 2006 induziert die Bildung von MGC aus Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ .

Aufgereinigte humane Monozyten wurden mit Medium (A), GM-CSF (800 U/ml; B), GM-CSF + Interferon- γ (1000 U/ml; C) und GM-CSF + Interferon- γ + CpG-ODN 2006 (6 μ g/ml; D) kultiviert. Nach drei Tagen in Kultur wurde mikroskopisch die Morphologie der Zellen bestimmt. Für eine detailliertere Analyse der Morphologie wurden die Kulturen mit GM-CSF + Interferon- γ (E) oder GM-CSF + Interferon- γ + CpG-ODN 2006 (F) mit May-Grünwald/Giemsa-Lösung gefärbt. Die Abbildung zeigt eines von 18 unabhängigen Experimenten (Vergrößerung x 200).

Monozyten in Kultur mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 wurden nach Entstehen von MGC mit dem TRAP-Assay auf tartratresistente saure Phosphatase untersucht. Dieses Enzym ist charakteristisch für aktivierte Makrophagen und Osteoklasten [Yaziji 1995; Vignery 2000; Janckila 2001]. MGC exprimierten tartratresistente saure Phosphatase (Abb. 1G).

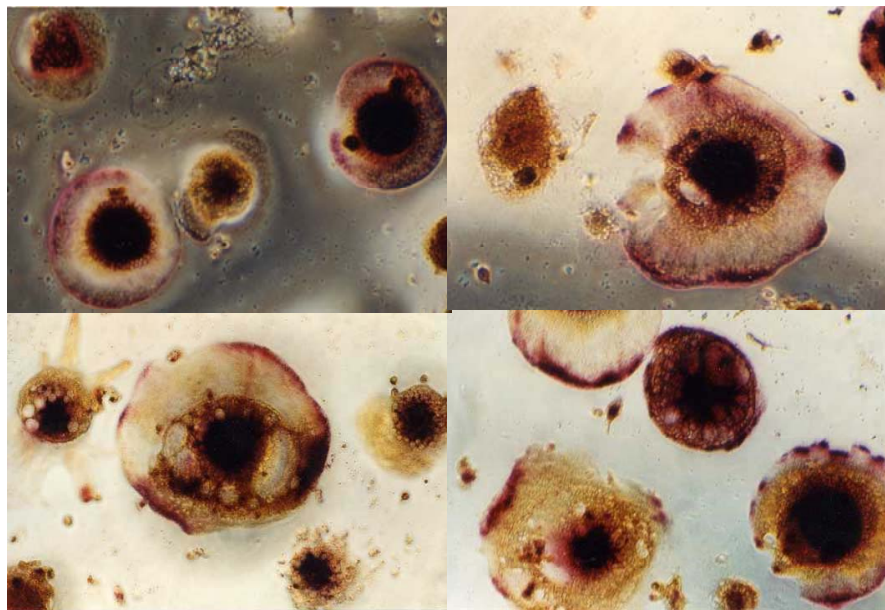


Abb. 1G: CpG-ODN 2006-induzierte MGC exprimieren tartratresistente saure Phosphatase

Aufgereinigte humane Monozyten wurden mit GM-CSF (800 U/ml; B) + Interferon- γ (1000 U/ml; C) + CpG-ODN 2006 (6 μ g/ml; D) kultiviert. Nach neun Tagen in Kultur wurden die Zellen mit dem TRAP-Assay auf Bildung von tartratresistenter saurer Phosphatase untersucht (Vergrößerung x 200). Die Abbildung zeigt eines von zwei Experimenten.

Die Anzahl der Kerne pro MGC variierte von zehn bis achtzig. Die MGC wurden nach drei, sieben und zehn Tagen in Kultur gezählt und die Anzahl der MGC in den verschiedenen Kulturbedingungen miteinander verglichen. In den Proben mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 wurden zu jedem Zeitpunkt signifikant mehr MGC gezählt als mit der Kombination von GM-CSF und Interferon- γ (Abb. 2, $p=0,027$). Nach durchschnittlich sieben Tagen in Kultur

wurde die Bildung von MGC auch bei Monozyten beobachtet, die mit der Kombination von GM-CSF und Interferon- γ inkubiert wurden. Das poly-C-Kontrolloligonukleotid erhöhte die durch GM-CSF und Interferon- γ induzierte MGC-Bildung nicht. Interessanterweise wurden keine MGC gefunden, wenn CpG-ODN 2216 zusätzlich zu GM-CSF und Interferon- γ zur Kultur gegeben wurde (Abb. 2).

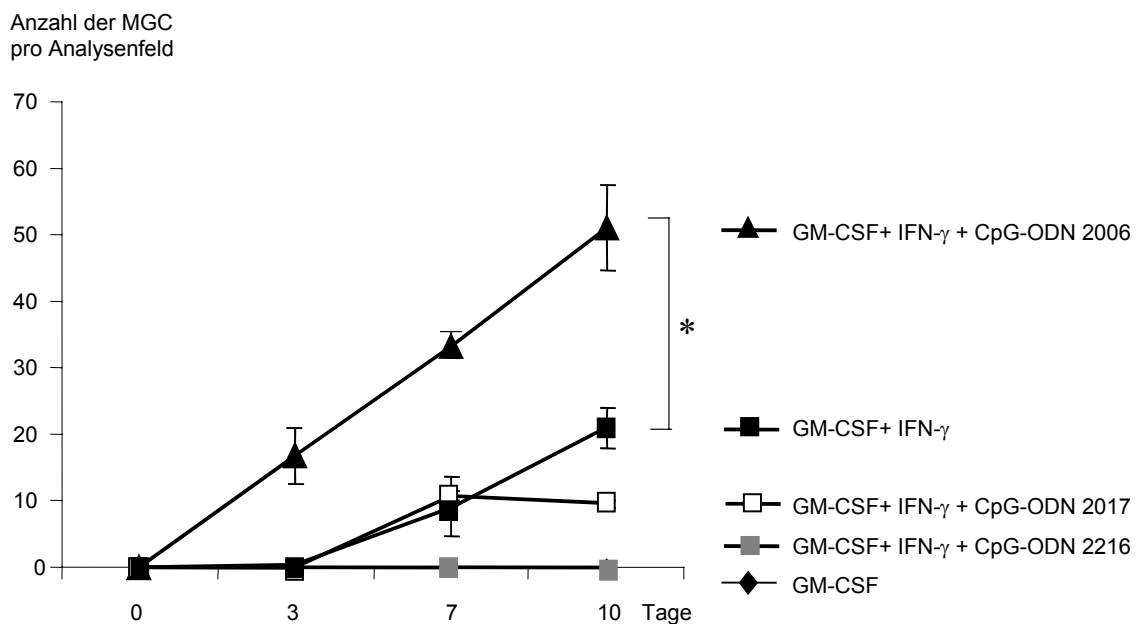


Abb. 2: CpG-ODN 2006 beschleunigt die Bildung von MGC aus Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ .

Monozyten wurden mit verschiedenen Kombinationen von GM-CSF, Interferon- γ , CpG-ODN 2006, CpG-ODN 2216 und dem Kontrolloligonukleotid 2017 kultiviert. Multinukleäre Riesenzellen (MGC) wurden definiert als Zellen mit mehr als zehn Zellkernen innerhalb der Zellmembran. Die Anzahl der MGC pro Analysenfeld wurde an drei verschiedenen Stellen des Kulturwells nach drei, sieben und zehn Tagen in Kultur bestimmt und das Ergebnis als Mittel der drei Werte angegeben ($n = 3$, $*p = 0,027$).

Die Kultur wurde bis zum Tag 15 weitergeführt. Bis zu diesem Zeitpunkt waren alle MGC viabel, wie durch Färbung mit Trypanblau gezeigt wurde.

Als nächstes wurde in den verschiedenen Kulturbedingungen die erforderliche Inkubationszeit bis zum ersten Erscheinen von MGC bestimmt. Mit der Dreierkombination GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 erschienen die ersten MGC nach durchschnittlich 2,8 Tagen. Mit der Kombination von GM-CSF und Interferon- γ dauerte es durchschnittlich 6,7 Tage bis zur ersten Bildung von MGC (Abb. 3).

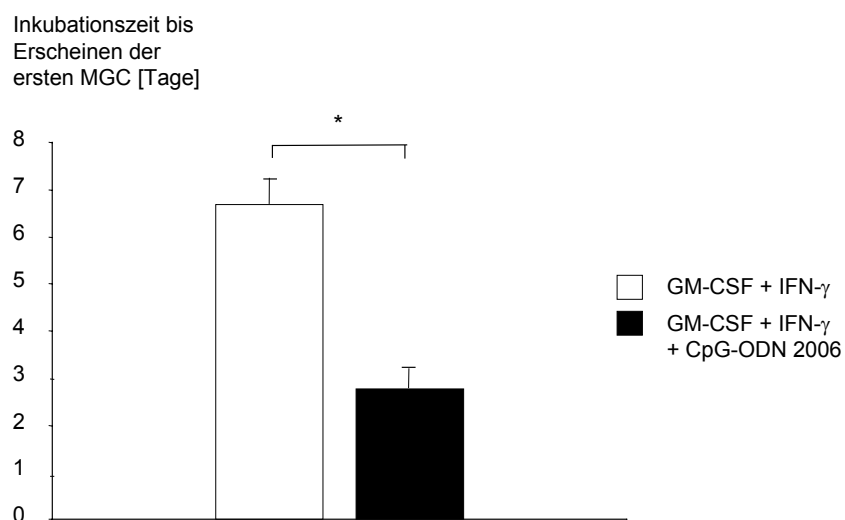


Abb. 3: CpG-ODN 2006 beschleunigt die Bildung von multinukleären Riesenzellen aus Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ .

Aufgereinigte humane Monozyten wurden mit GM-CSF und Interferon- γ (weiße Balken) oder GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 (schwarze Balken) kultiviert. Die Kulturen wurden jeden Tag mikroskopisch auf die Entstehung von MGC untersucht. Die Abbildung zeigt die Inkubationszeit bis zum Erscheinen der ersten MGC. Die Proben, in denen im beobachteten Zeitraum keine Bildung von MGC stattfand, wurden mit einer Dauer von zehn Tagen berücksichtigt (n = 18, *p < 0,0001).

3.1.2 Die CpG-Oligonukleotid-induzierte Bildung von multinukleären Riesenzellen ist abhängig von der Konzentration des Oligonukleotids

Um den Einfluss der Konzentration von CpG-ODN 2006 auf die MGC-Bildung zu untersuchen, wurden frisch isolierte humane Monozyten mit GM-CSF, Interferon- γ und einer Konzentrationsreihe von CpG-ODN 2006 kultiviert. Die MGC wurden nach drei und sieben Tagen der Kultur gezählt. Nach zehn Tagen wurde die Kultur abgebrochen. Mit Hilfe der May-Grünwald/Giemsa-Färbung wurde der Fusionsindex der Monozyten bestimmt. Der Fusionsindex FI berechnet sich nach folgender Formel:

FI = Zahl der Nuklei innerhalb von MGC/ Gesamtzahl der Nuklei im Analysenfeld x100 [%]

Die Bildung von MGC war zu jedem Zeitpunkt abhängig von der Konzentration des Oligonukleotids, wie der Anstieg des Fusionsindex mit steigender Oligonukleotidkonzentration zeigt (Abb. 4A und B).

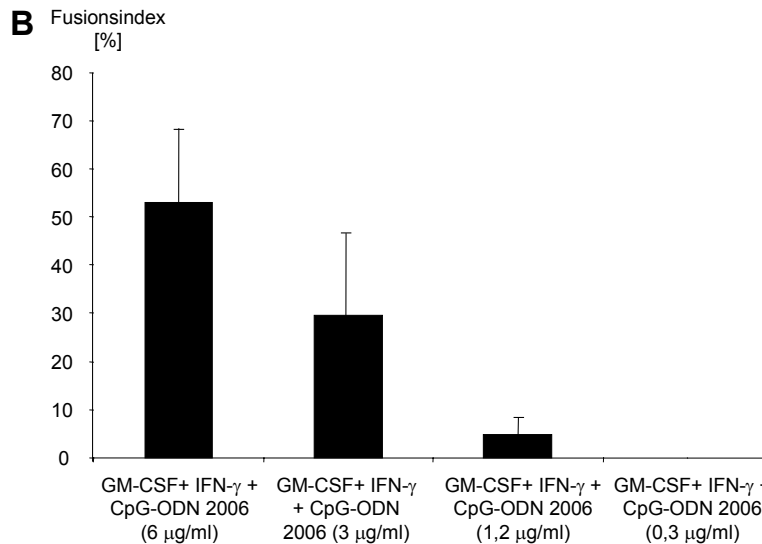
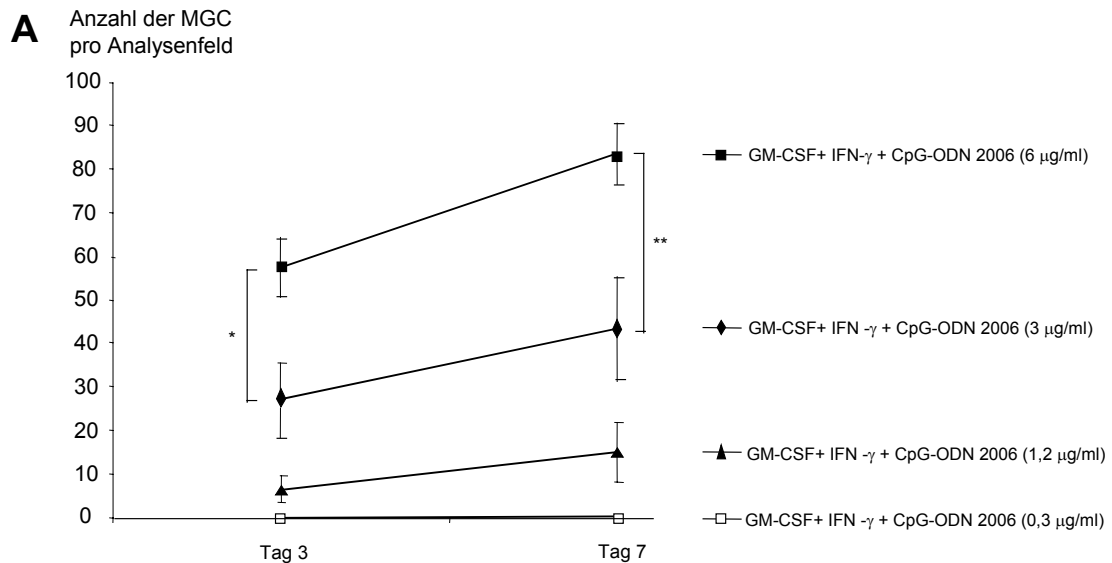


Abb. 4: Die CpG-ODN-induzierte Bildung von MGC ist abhängig von der Konzentration des Oligonukleotids.

Aufgereinigte humane Monozyten wurden mit GM-CSF, Interferon- γ und verschiedenen Konzentrationen von CpG-ODN 2006 kultiviert. Am dritten und siebten Tag der Kultur wurden die MGC gezählt (Abb. 4A, $n = 3$, $*p = 0,03$; $**p = 0,04$). Nach zehn Tagen in Kultur wurden die Zellen mit May-Grünwald/Giemsa-Lösung gefärbt und die Anzahl der MGC, Monozyten und Zellkerne bestimmt (Abb. 4B; $n = 3$). Die Zählungen erfolgten jeweils in drei verschiedenen Analysenfeldern des Kulturwells. Das Ergebnis wurde als Mittel der drei Werte angegeben. Der Fusionsindex FI wurde nach folgender Formel berechnet:

$FI = \text{Anzahl der Nuklei innerhalb von MGC} / \text{Gesamtzahl der Nuklei} \times 100 [\%]$.

3.1.3 Einfluss der Isolationsmethode auf die Generierung von multinukleären Riesenzellen

Zur Etablierung eines Protokolls zur Herstellung von MGC in vitro wurden verschiedene Isolierungsmethoden der Monozyten aus PBMC getestet. Zum einen wurden Monozyten durch magnetische Negativselektion isoliert. Dabei werden alle anderen Zelltypen magnetisch markiert. Bei der anschließenden Passage durch eine Magnetsäule werden die markierten Zellen in der Säule retiniert. Im Eluat befinden sich nur die nicht markierten Monozyten. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Monozyten unberührt bleiben.

Eine andere Methode ist die Positivselektion. Monozyten innerhalb der PBMC-Fraktion werden mit magnetischen anti-CD14-Beads markiert. Bei der anschließenden Passage werden die Monozyten in der Magnetsäule retiniert. Nach Entfernen des Magnetfelds werden die Monozyten mit Spülflüssigkeit aus der Säule eluiert.

Eine dritte Isolierungsmethode nutzt die Tatsache, dass Monozyten im Gegensatz zu den anderen Zelltypen innerhalb der PBMC an Plastikoberflächen adhären. Die nicht adhärenen Zellen werden dekantiert und verworfen. Die Monozyten werden nach einem Waschschrift mit einem Zellschaber von der Plastikoberfläche geerntet.

Die höchste Reinheit wird mit der Negativselektion erreicht. Sie bringt durchschnittlich 87 Prozent an CD14-positiven Zellen, wohingegen Positivselektion und Adhärenzmethode bei weniger als 80% Reinheit liegen.

Die größte Anzahl an MGC entsteht in Monozytenpräparationen, die durch die Negativselektion aufgereinigt wurden, gefolgt von Präparationen durch Positivselektion. Am wenigsten MGC entstehen bei adhärenzisolierten Monozyten (Abb. 5).

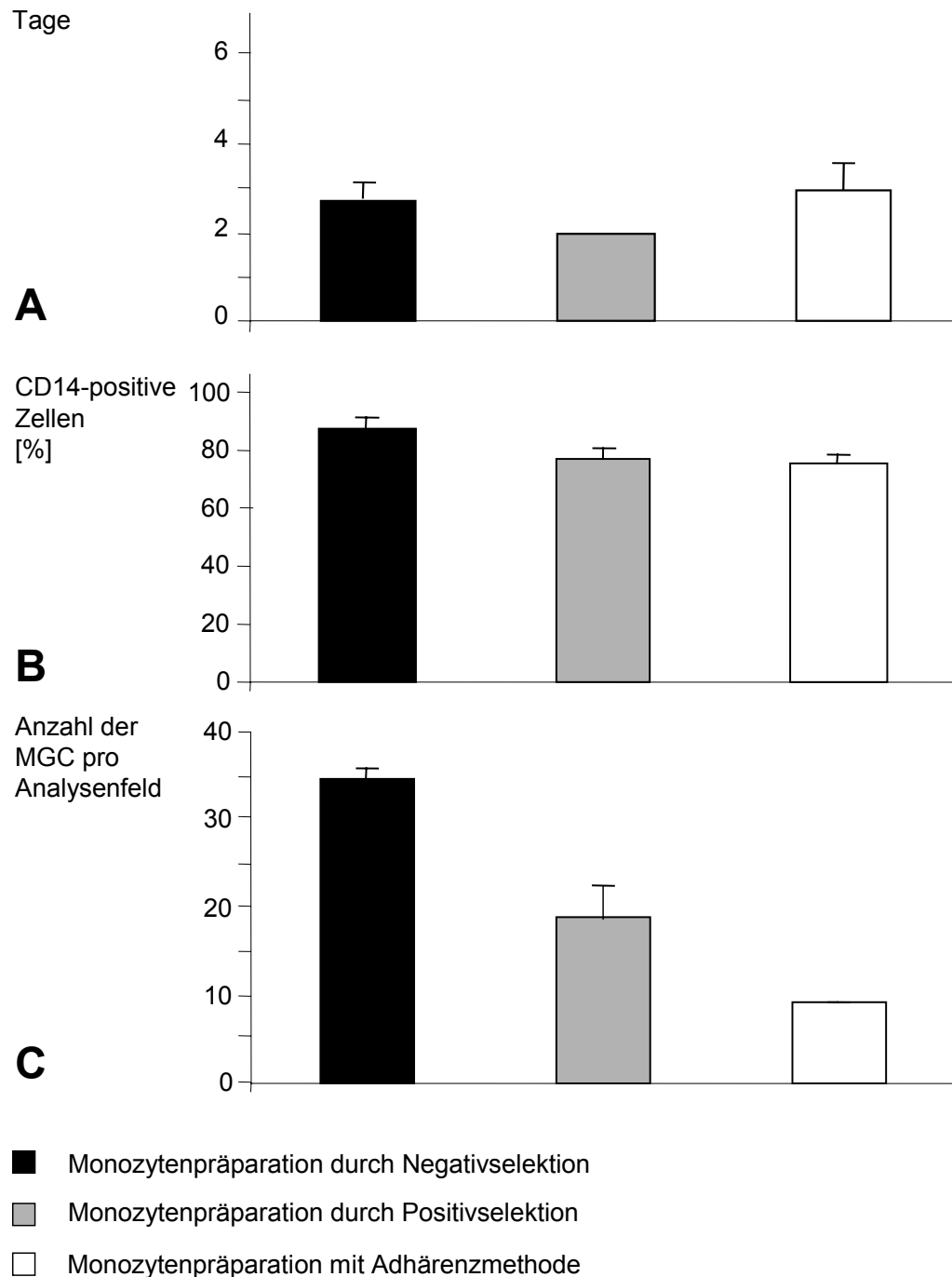


Abb. 5: Einfluss der Isolierungsmethode auf die Generierung von MGC

Monozyten wurden mit verschiedenen Isolierungsmethoden aus PBMC isoliert: durch Negativselektion (schwarze Balken), Positivselektion (graue Balken) und mit der Adhärenzmethode (weiße Balken). Nach der Isolierung wurde durchflusszytometrisch die Reinheit der Monozytenpräparation anhand des Gehalts an CD14 positiven Zellen bestimmt (A, n = 3). Dann wurden die Monozyten mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 wie beschrieben inkubiert und täglich mikroskopisch die Morphologie beobachtet. Es wurde die Inkubationszeit bestimmt, die nötig ist bis zum Erscheinen von MGC (B, n = 3). Nach neun Tagen wurde die Kultur abgebrochen und die Zellen mit May-Grünwald/Giemsa-Lösung gefärbt. Dann wurde mikroskopisch die Anzahl der MGC pro Analysenfeld bestimmt (C, Adhärenzmethode n = 1; Negativselektion/Positivselektion n = 3).

3.2 Die Rolle von Interferon- α bei der Bildung von multinukleären Riesenzellen

Um die unterschiedlichen Effekte der CpG-Oligonukleotide 2006 und 2216 zu erklären, wurde der Einfluss von Interferon- α auf die Monozytendifferenzierung untersucht. CpG-ODN 2216 induziert Typ I-Interferon in plasmazytoiden dendritischen Zellen. In den in dieser Arbeit verwendeten Monozytenpräparationen waren PDC in Konzentrationen von 0 bis 1 % enthalten. Aufgereinigte humane Monozyten wurden mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 kultiviert. Zu einigen Proben wurde eine Dreifachkombination von blockierenden Antikörpern gegen IFN- α / β und IFN- α -Rezeptor (Anti- α / β /R) am Beginn der Kultur und bei jedem Medienwechsel zugegeben. Nach drei und sieben Kulturtagen wurden die MGC gezählt. Nach neun Tagen wurde die Kultur abgebrochen und nach May-Grünwald/Giemsa-Färbung der Fusionsindex bestimmt. Die Zugabe von Anti- α / β /R - Antikörpern blockierte die durch CpG-ODN 2006 induzierte Bildung von MGC zu jedem Zeitpunkt (Abb.6A und B). Typ I-Interferon ist also für die MGC-Bildung nötig. In einem anderen Experiment wurde ein blockierender Antikörper gegen Interleukin-12 zu Beginn der Kultur zugegeben. Im Gegensatz zur Zugabe von Antikörpern gegen IFN- α / β und IFN- α -Rezeptor wurde dabei die Bildung von MGC nicht beeinträchtigt (Abb. 6C).

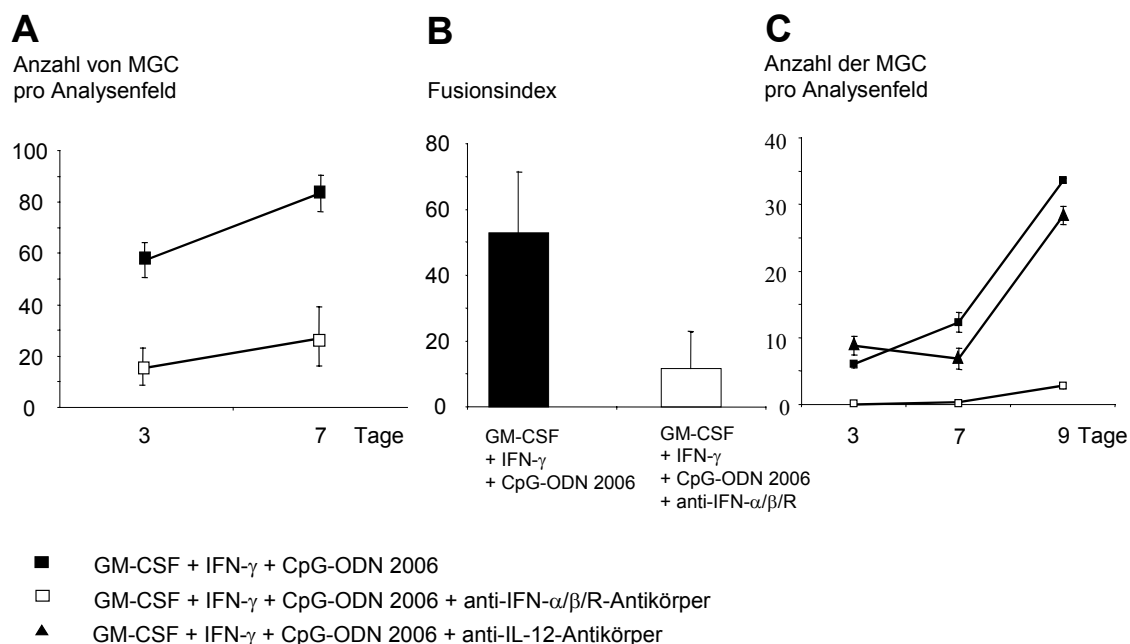


Abb. 6: Die CpG-ODN 2006-induzierte Bildung von MGC ist abhängig von Interferon- α .

Aufgereinigte Monozyten wurden mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 kultiviert. Zu einigen Proben wurden zu Beginn der Kultur und bei jedem Medienwechsel blockierende Antikörper gegen IFN- α/β und gegen den IFN- α -Rezeptor gegeben (offene Quadrate). Die Anzahl der MGC pro Analysenfeld wurde nach drei und sieben Tagen in Kultur bestimmt (Abb. 6A). Nach neun Tagen in Kultur wurde nach May-Grünwald/Giemsa-Färbung der Fusionsindex mikroskopisch bestimmt (Abb. 6B). In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden zu einigen Proben blockierende Antikörper gegen IL-12 zugegeben (schwarze Dreiecke). Die Anzahl der MGC wurde nach drei, fünf und neun Tagen in Kultur mikroskopisch bestimmt (Abb. 6C). (Abb. 6A, 6B: n = 3; Abb. 6C: n = 2; mean +/- SEM).

Um zu sehen, ob Interferon- α die Bildung von MGC aus Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ induzieren kann, wurden aufgereinigte humane Monozyten mit einem durchschnittlichen Gehalt von 0,34% PDC mit GM-CSF und Interferon- γ inkubiert und zu Beginn der Kultur eine Konzentrationsreihe von rekombinantem Interferon- α zugegeben. In einem anderen Ansatz wurde eine Konzentrationsreihe von Interferon- α zu der Kulturbedingung GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 gegeben. Nach neun Kulturtagen wurde in beiden Ansätzen nach May-Grünwald/Giemsa-Färbung der Fusionsindex

bestimmt. Anders als erwartet, induzierte Interferon- α keine MGC-Bildung in den mit GM-CSF und Interferon- γ kultivierten Monozyten. In der Dreierkombination mit CpG-ODN 2006 wurde die MGC-Bildung durch Interferon- α sogar konzentrationsabhängig gehemmt (Abb.7).

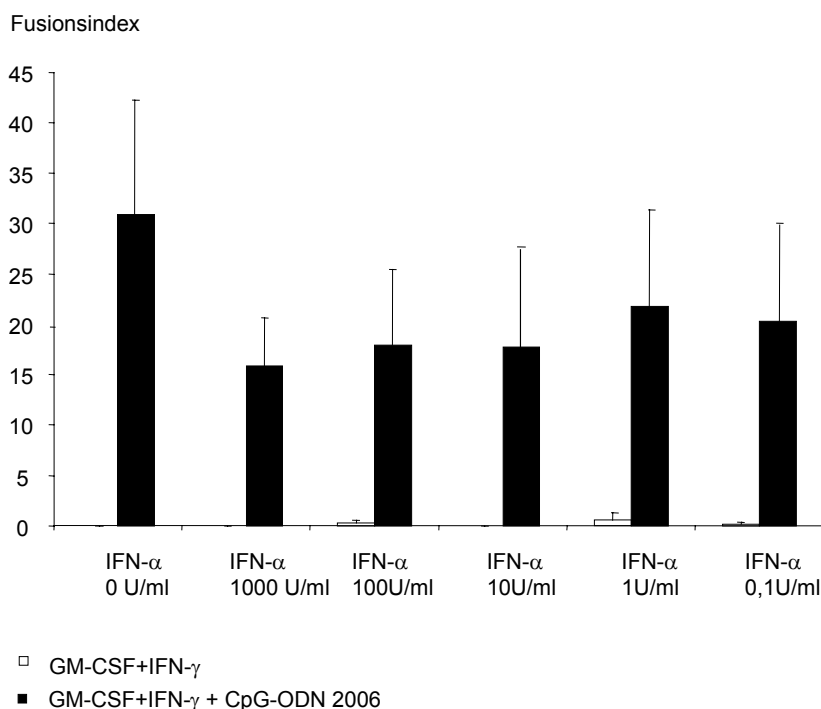


Abb. 7: Rekombinantes IFN- α induziert keine MGC in Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ .

Aufgereinigte Monozytenpräparationen, die durchschnittlich 0,34% plasmazytoide dendritische Zellen enthalten, wurden mit GM-CSF und Interferon- γ (schwarze Balken) und GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 (graue Balken) kultiviert. Zu Beginn der Kultur wurde rekombinantes Interferon- α in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Der Fusionsindex wurde nach neun Tagen in Kultur durch mikroskopische Analyse von May-Grünwald/Giemsa-gefärbten Proben bestimmt (n=3, mean +/- SEM).

Als nächstes wurde der Effekt von plasmazytoiden dendritischen Zellen auf die Bildung von MGC untersucht. Aufgereinigte Monozytenpräparationen mit weniger als 0,02% PDC-Gehalt wurden mit Präparationen verglichen, die mehr als 0,2 % an PDC enthielten. Die Bildung von MGC aus Monozyten, die mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 kultiviert wurden, war in Präparationen mit geringem PDC-Gehalt signifikant höher (Abb.8).

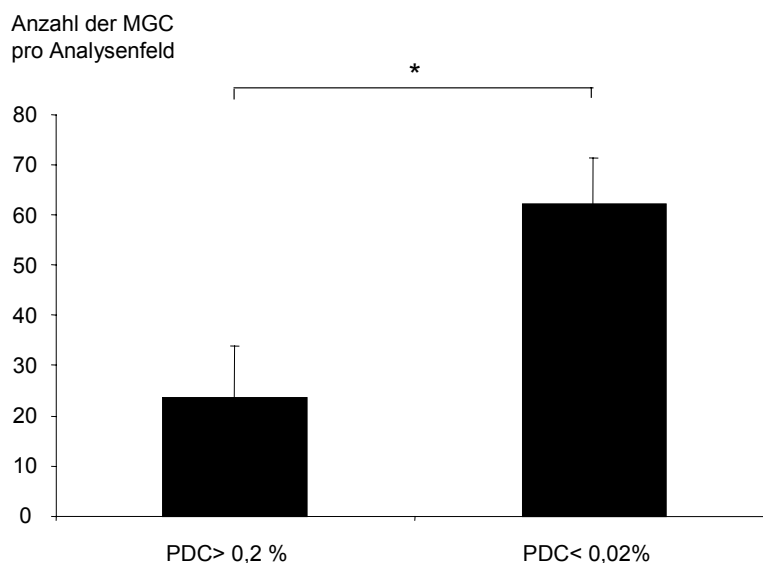


Abb. 8: Die MGC-Bildung in Monozytenpräparationen mit hohem Gehalt an plasmazytoiden dendritischen Zellen ist vermindert verglichen mit Präparationen mit niedrigem PDC-Gehalt.

Monozytenpräparationen, die mehr als 0,2 % an PDC enthalten und Präparationen mit weniger als 0,02 % an PDC wurden mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 kultiviert. Nach drei Tagen in Kultur wurde die Anzahl der MGC pro Analysenfeld mikroskopisch bestimmt. Die Monozyten wurden durch Positivselektion mit Hilfe von Markierung mit magnetischen CD14-Beads isoliert. PDC wurden durch Markierung mit magnetischen BDCA-4-Beads depletiert (PDC >0,2: n=3; PDC < 0,02 %: n=4; +/- SEM; * p=0,038; ungepaarter t-Test).

Die Präsenz von geringen Mengen an Typ I-Interferon ist für die CpG-ODN-induzierte Bildung von MGC nötig. Hingegen hemmen hohe Konzentrationen an IFN- α die Fusion von Monozyten zu MGC.

3.3 Eigenschaften von multinukleären Riesenzellen und Monozyten auf dem Differenzierungsweg zu multinukleären Riesenzellen im Hinblick auf Abwehr intrazellulärer Infektionen

3.3.1 Monozyten im Differenzierungsprozess zu multinukleären Riesenzellen exprimieren kostimulatorische und antigenpräsentierende Moleküle und haben eine verminderte CD14-Expression

Zur effektiven Antigenpräsentation wird auf Monozyten und Makrophagen die Expression von MHC I, MHC II und kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) benötigt [Janeway 1999]. Aufgereinigte humane Monozyten, die mittels Negativselektion isoliert wurden und somit unberührt sind, wurden mit verschiedenen Kombinationen von GM-CSF, Interferon- γ , CpG-ODN 2006, CpG-ODN 2216 und LPS inkubiert. Nach zwei Kulturtagen wurde durchflusszytometrisch die Expression von Oberflächenmarkern auf den Monozyten gemessen. Eine durchflusszytometrische Messung ist nur möglich, solange noch keine MGC entstanden sind, da diese aufgrund ihrer Größe das Gerät verstopfen würden. Monozyten, die mit GM-CSF und Interferon- γ kultiviert wurden, regulieren im Vergleich zu GM-CSF alleine CD80, CD86 und MHC II hoch. Die Zugabe von CpG-ODN 2006 erhöhte die Expression von CD80, CD86 und MHC II nicht. Auf Zugabe von CpG-ODN 2216 regulierten die Monozyten CD86 und MHC II im Vergleich zur Kulturbedingung mit GM-CSF und Interferon- γ hoch. Die Zugabe von LPS veränderte die durch GM-CSF und Interferon- γ induzierte Expression der drei Oberflächenmarker nicht (Abb. 9A). Monozyten im Differenzierungsprozess zu MGC exprimieren CD80, CD86 und HLA-DR, aber in geringerem Maße als Monozyten, die mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2216 inkubiert wurden.

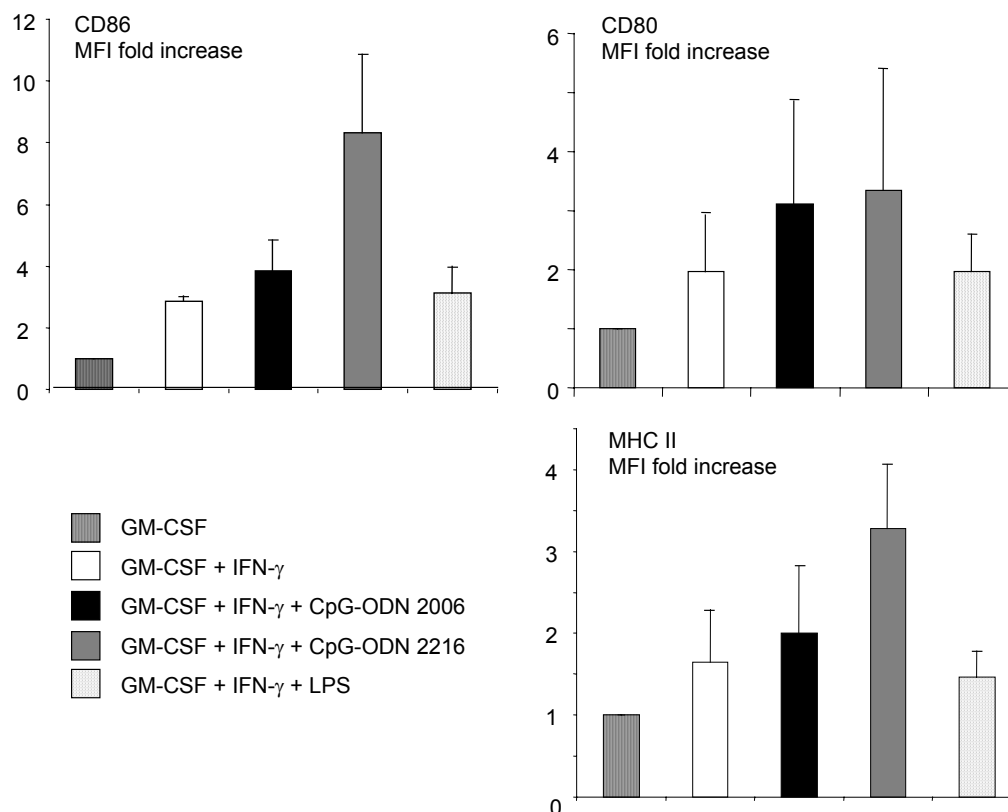


Abb. 9A: Monozyten im Differenzierungsprozess zu MGC exprimieren CD80, CD86 und MHC II.

Aufgereinigte humane Monozyten wurden mit verschiedenen Kombinationen von GM-CSF, Interferon- γ , CpG-ODN 2006, CpG-ODN 2216 oder LPS wie angegeben kultiviert. Nach zwei Tagen in Kultur wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch auf die Expression von CD80, CD86 und MHC II untersucht. Die Abbildung zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität MFI angegeben als Vielfaches der Fluoreszenzintensität der Vergleichsbedingung mit GM-CSF, die als MFI = 1 definiert wurde (MFI als fold increase, CD 80: n = 3; CD86, HLA-DR: n = 4).

CD14 ist an der Funktion von Monozyten in intrazellulären Infektionen wie *Mycobacterium tuberculosis* beteiligt [Fenton und Vermeulen 1996]. Deshalb wurde die CD14-Expression von Monozyten unter Einfluss von GM-CSF, Interferon- γ , CpG-ODN 2006 und LPS untersucht. Nach zwei Tagen der Inkubation in unterschiedlichen Kulturbedingungen wurde die CD14-Expression der Monozyten mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die CD14-Expression von GM-CSF-geprägten Monozyten wurde durch Interferon- γ herunterreguliert. Die Zugabe von CpG-ODN 2006 hatte keinen Effekt auf die CD14-Expression. LPS hingegen erhöhte die CD14-Expression (Abb. 9B). Dies weist auf einen funktionellen Unterschied zwischen CpG-ODN 2006 und LPS in bezug auf die Monozytendifferenzierung hin.

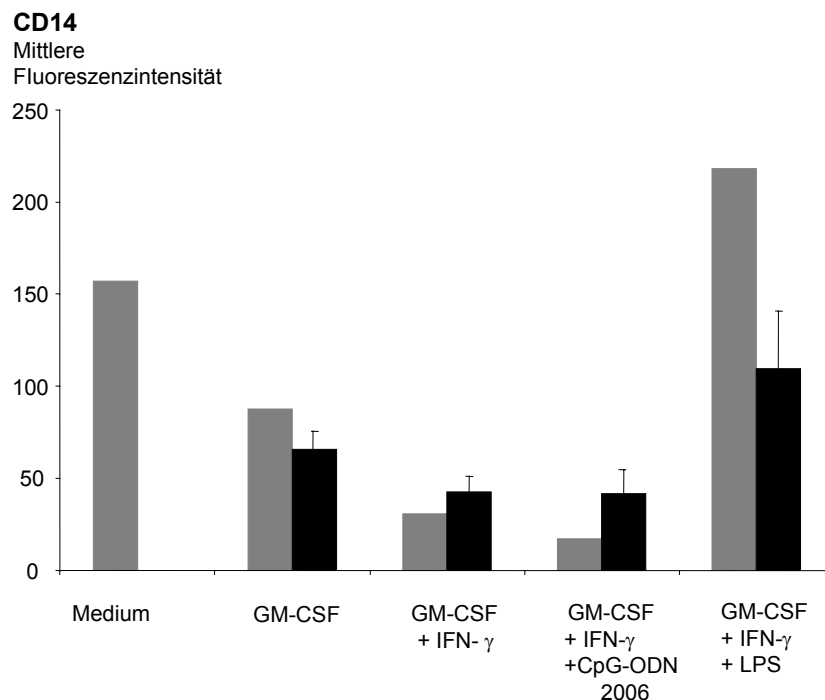


Abb. 9B: CpG-ODN 2006 und LPS beeinflussen in unterschiedlicher Weise die CD14-Expression von Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ .

Aufgereinigte humane Monozyten wurden in den angegebenen Kulturbedingungen inkubiert. Nach zwei Tagen in Kultur wurde ihre CD14-Expression durchflusszytometrisch gemessen. Die grauen Balken stellen ein einzelnes Experiment dar, das als Kontrollbedingung Monozyten in Medium ohne Stimulus enthält. Die schwarzen Balken repräsentieren ein Mittel von fünf Experimenten. Die Expression von CD14 ist ausgedrückt als mittlere Fluoreszenzintensität MFI.

3.3.2 Makrophagen, die phagozytiert haben, bewahren ihre Fähigkeit zur Fusion

Die Fähigkeit zur Phagozytose ist eine der wichtigsten Eigenschaften von professionellen antigenpräsentierenden Zellen zur Abwehr intrazellulärer Infektionen. Fusion von Monozyten bewirkt eine verschlechterte Phagozytoseaktivität der resultierenden MGC [Mariano und Spector 1974; Papadimitriou und Walters 1979; Weinberg 1985; Fais 1997]. Im folgenden Experiment wurde untersucht, inwieweit Monozyten phagozytieren und anschließend fusionieren können.

Als Vorversuch wurde die Phagozytoseaktivität von frisch isolierten Monozyten verglichen mit der Phagozytoseaktivität von Monozyten, die vier Tage lang mit GM-CSF zu Makrophagen differenziert wurden. Um ein einheitliches Zellbild am Ende der viertägigen Kulturzeit zu erhalten, wurden die Monozyten nach der Phagozytose mit GM-CSF inkubiert. Auch im experimentellen Ansatz dieser Arbeit war - wie bereits in der Literatur beschrieben - die Phagozytoseaktivität von Makrophagen geringer als die Phagozytoseaktivität frisch isolierter Monozyten (Abb.10). Frisch isolierte Monozyten phagozytierten die Latexbeads in großem Ausmaß.

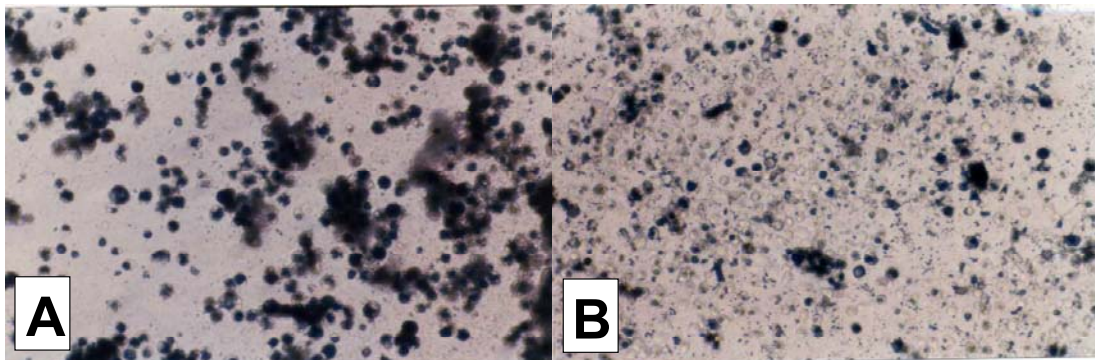


Abb. 10: Frisch isolierte Monozyten haben eine größere Phagozytosekapazität als Makrophagen.

Frisch isolierte Monozyten wurden drei Stunden lang mit Latexbeads inkubiert. Nach Wegwaschen der Latexbeads wurden die Monozyten vier Tage lang mit GM-CSF kultiviert. Am vierten Tag wurde mikroskopisch die Phagozytoseaktivität analysiert (A). In einem anderen Ansatz wurden frisch isolierte Monozyten vier Tage lang mit GM-CSF zu Makrophagen gereift. Am vierten Tag der Kultur wurden die Zellen drei Stunden lang mit Latexbeads inkubiert. Nach dem Abwaschen der Latexbeads wurde die Phagozytoseaktivität mikroskopisch analysiert (B). Die Abbildung zeigt eines von zwei Experimenten.

Im anschließenden Versuch wurden frisch isolierte humane Monozyten mit Latexbeads drei Stunden lang inkubiert. Nach Wegwaschen der Latexbeads wurden die Monozyten mit verschiedenen Kombinationen von GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 weiterkultiviert. Nach fünf Tagen der Kultur wurde die Fusion der Monozyten zu MGC mittels Mikroskopie bestimmt. Die Latexbeads wurden gemäß dem Vorversuch von den Monozyten gut aufgenommen. Im Laufe der weiteren Kultur mit GM-CSF, Interferon- γ und

CpG-ODN 2006 bildeten sich MGC mit intrazellulären Latexbeads (Abb. 11A und B). Monozyten, die phagozytiert haben, bewahren sich also die Fähigkeit, zu MGC zu fusionieren.

In einem anderen experimentellen Ansatz wurde untersucht, ob Monozyten, die phagozytiert haben, mit bereits bestehenden MGC fusionieren können. Dazu wurden Latexbeads zu vier Tage alten Kulturen von Monozyten mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 gegeben. Zu diesem Zeitpunkt sind in der Kultur schon MGC vorhanden. Nach drei Stunden der Inkubation wurden nicht phagozytierte Latexbeads gewaschen. Nach einem weiteren Tag der Kultur wurde qualitativ mikroskopisch analysiert, ob sich Latexbeads innerhalb von MGC befinden. Auch in diesem Ansatz wurden Monozyten intrazellulär in MGC gefunden. Monozyten, die phagozytiert haben, können auch mit bereits bestehenden MGC fusionieren (Abb. 11D).

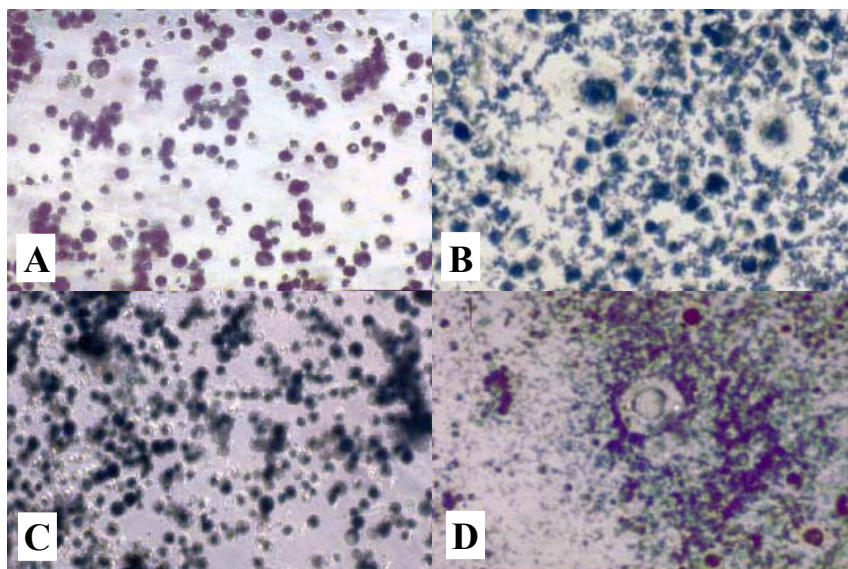


Abb. 11A-D: Monozyten, die phagozytiert haben, können MGC bilden und mit bereits bestehenden MGC fusionieren

Blaue Latexbeads wurden zu frisch isolierten Monozyten gegeben. Nach drei Stunden wurden die nicht phagozytierten Beads abgewaschen. Dann wurden die Monozyten mit GM-CSF (A) oder GM-CSF+ IFN- γ + CpG-ODN 2006 (B) fünf Tage lang kultiviert und die MGC-Bildung mikroskopisch analysiert (Vergrößerung x 200). Die Abbildungen A und B zeigen eines von zwei unabhängigen Experimenten. In einem anderen Ansatz wurden frisch isolierte Monozyten mit GM-CSF (C) und GM-CSF+ IFN- γ + CpG-ODN 2006 (D) vier Tage lang kultiviert. Am vierten Tag wurden Latexbeads auf die Kulturen gegeben. Nach einer drei Stunden wurden die Latexbeads abgewaschen. Nach einem weiteren Tag der Kultur wurde die Phagozytoseaktivität mikroskopisch analysiert. Die Abbildungen C und D zeigen eines von drei Experimenten.

3.3.3 Multinukleäre Riesenzellen exprimieren MHC I und MHC II

Um zu untersuchen, ob MGC die nötigen Signale für eine T-Zell-Aktivierung liefern können, wurde die Expression von MHC I und II mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Multinukleäre Riesenzellen exprimierten große Mengen an MHC I (Abb. 12A) und MHC II (Abb. 12B). Außerdem färbten sich auf MGC auch CD86 und CD80 an (nicht in Abbildung).

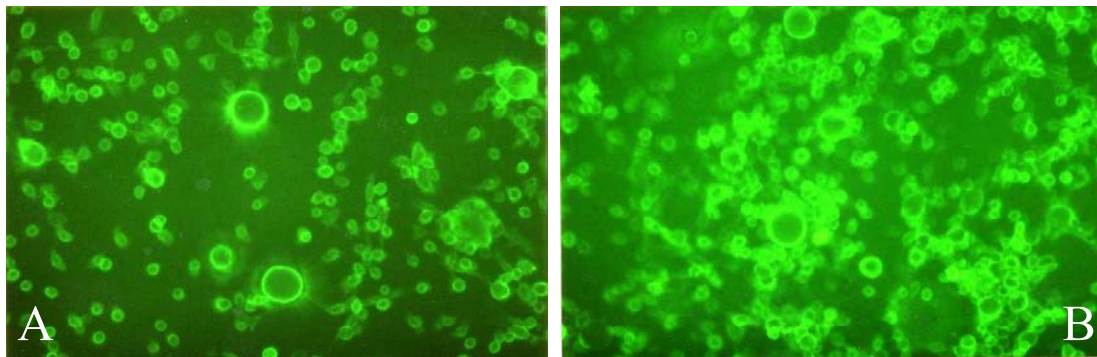


Abb. 12A, B: Multinukleäre Riesenzellen exprimieren MHC I und MHC II

Monozytenpräparationen wurden nach fünf Tagen in Kultur mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 mit FITC-markierten Antikörpern gegen MHC I (Abb. 12A) und MHC II (Abb. 12B) gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop bei 200facher Vergrößerung sind MHC I und MHC II jeweils an der grünen Fluoreszenz der Zelloberfläche gut zu erkennen. Die Abbildung zeigt eines von vier unabhängigen Experimenten.

3.3.4 Multinukleäre Riesenzellen begrenzen intrazelluläre Infektionen mit *Leishmania major*

CpG-ODN 2006 zeigte in verschiedenen Studien eine protektive Wirkung gegenüber intrazellulären Infektionen. Um eine Funktion der CpG-ODN-induzierten MGC in der Kontrolle intrazellulärer Infektionen zu zeigen, wurden Makrophagen mit dem intrazellulären Protozoen *Leishmania major* (*L. major*) infiziert. Leishmanieninfektionen werden als Modell zur Erforschung von Immunantworten auf intrazelluläre Infektionen eingesetzt [Sacks 1998; Herwaldt 1999].

Aufgereinigte humane Monozyten wurden mit verschiedenen Kombinationen von GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 kultiviert. Nach sechs Tagen wurde *Leishmania major* inokuliert und nach einer Inkubationszeit von vier Stunden gewaschen. Eine Stunde und zwei Tage nach dem Waschschrift wurde die Anzahl der intrazellulären Parasiten in Makrophagen und MGC mittels mikroskopischer Analyse nach May-Grünwald/Giemsa-Färbung bestimmt. Makrophagen wurden in großem Ausmaß von *L. major* infiziert. Die verschiedenen Kulturbedingungen zeigten dabei keine Unterschiede in der Infektionsrate (% *Leishmania*-positiver Zellen). Die Infektionsrate änderte sich im Verlauf der weiteren Kultur über zwei Tage nicht signifikant. Das heißt, die Leishmanien wurden in keiner der Kulturbedingungen auf nicht infizierte Makrophagen übertragen (Abb.13).

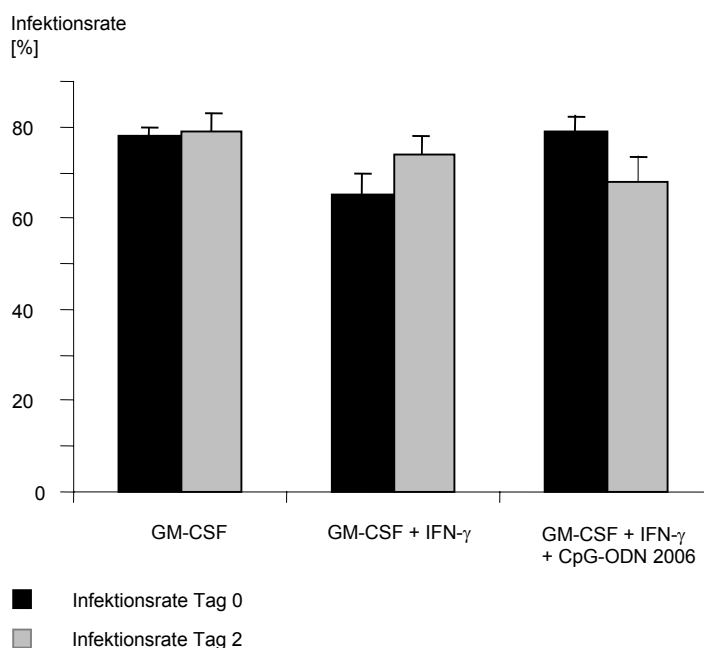


Abb. 13: Makrophagen werden unabhängig von der Kulturbedingung in hohem Maße von *Leishmanien* infiziert.

Aufgereinigte humane Monozyten, die sechs Tage lang in den angegebenen Bedingungen kultiviert wurden, wurden vier Stunden lang mit *Leishmania major* inkubiert. Dann wurden extrazelluläre Parasiten gewaschen. Eine Stunde (schwarze Balken) oder zwei Tage (graue Balken) nach dem Waschschrift wurden die Proben mit May-Grünwald/Giemsa-Lösung gefärbt. Dann wurde mikroskopisch die Zahl der infizierten Makrophagen und die Gesamtzahl der Makrophagen pro Analysenfeld (1,2 mm²; definiert durch den Fotorahmen des Mikroskops) bestimmt (n = 3; +/- SEM). Die Infektionsrate berechnet sich nach folgender Formel:

Infektionsrate [%] = Zahl der infizierten Makrophagen / Gesamtzahl der Makrophagen x 100

MGC hingegen wurden nur in geringem Maß infiziert. Makrophagen jeder Kulturbedingung wiesen innerhalb der zwei Tage nach Infektion eine hohe Replikationsrate der intrazellulären *L. major* auf, gemessen anhand der Zahl der Leishmanien pro Zelle). Innerhalb der MGC hingegen war keine Replikation detektierbar. Dies deutet auf eine wichtige Rolle für die MGC in der Kontrolle intrazellulärer Infektionen hin (Abb. 14, 15).

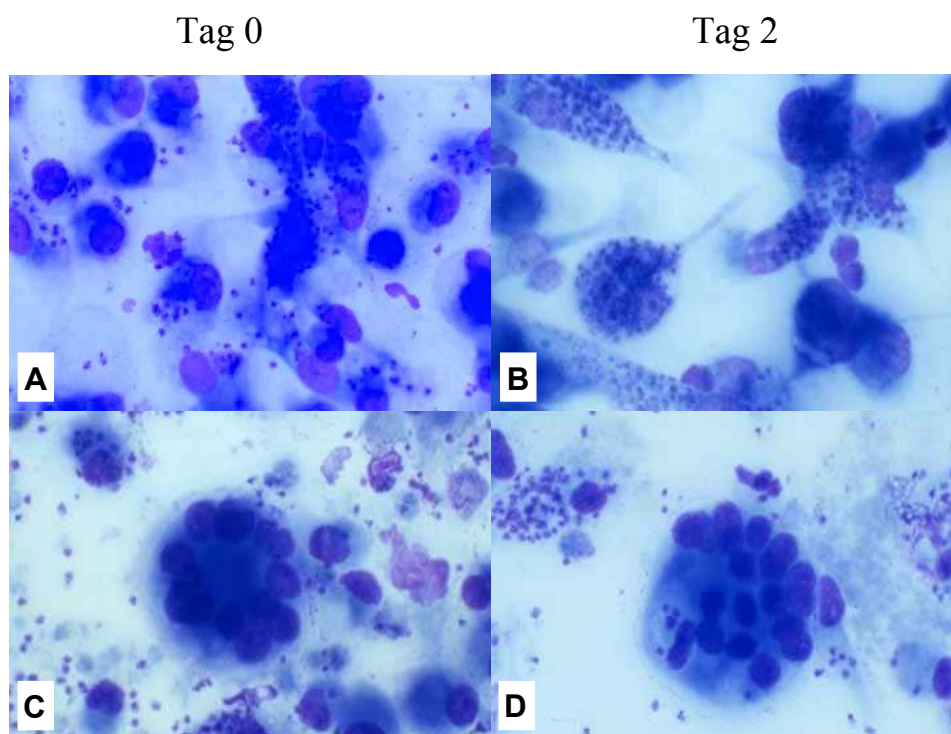


Abb.14: Leishmania major infizieren MGC in geringerem Ausmaß als Makrophagen und zeigen verminderte Replikation innerhalb der MGC verglichen mit Makrophagen.

Monozyten wurden sechs Tage lang mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 kultiviert und dann mit *Leishmania major* vier Stunden lang inkubiert. Einige Proben wurden eine Stunde nach dem Abwaschen extrazellulärer Parasiten mit May-Grünwald/Giemsa-Lösung gefärbt. Die anderen Proben wurden zwei Tage nach dem Abwaschen extrazellulärer Parasiten mit May-Grünwald/Giemsa-Lösung gefärbt. Die Leishmanien sind an ihrer dunkelvioletten Färbung zu erkennen. Das Ausmaß der Infektion und der intrazellulären Replikation innerhalb der Makrophagen (A,B) und der MGC (C,D) wurde mikroskopisch bestimmt (Vergrößerung x 630).

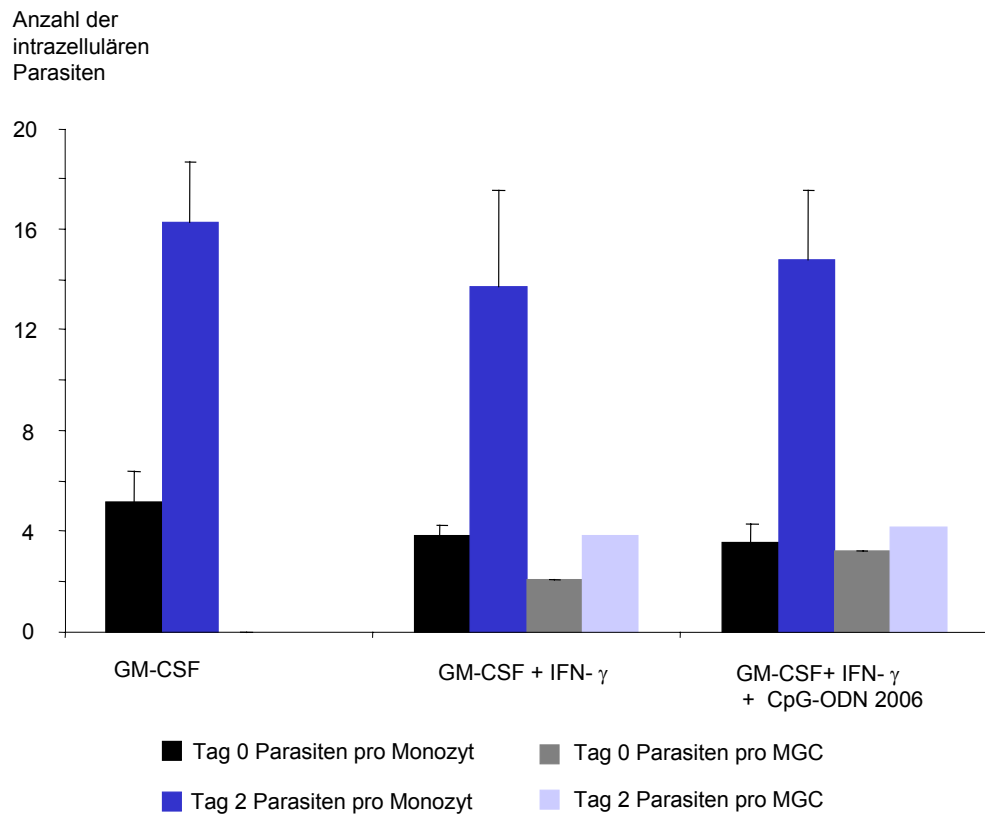


Abb. 15: Leishmania major infiziert MGC in geringerem Ausmaß als Makrophagen und zeigt weniger Replikation innerhalb der MGC als in Makrophagen.

Monozyten wurden sechs Tage lang in den angegebenen Bedingungen kultiviert und dann vier Stunden lang mit *Leishmania major* inkubiert. Eine Stunde (schwarze und graue Balken) und zwei Tage (blaue und hellblaue Balken) nach der Infektion wurde die Anzahl der Parasiten in Makrophagen und MGC mikroskopisch bestimmt (Parasiten pro Makrophage: $n = 3$, mean \pm SEM; Parasiten pro MGC: $n = 1$).

4. Diskussion

4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass CpG-ODN 2006 die Bildung von MGC vom Langhans-Typ in humanen Monozyten fördert, die mit GM-CSF und Interferon- γ kultiviert wurden. Diese MGC können intrazelluläre Infektionen mit *Leishmania major* kontrollieren.

CpG-ODN 2006 beschleunigt die Bildung von MGC aus Monozyten, die mit GM-CSF und Interferon- γ geprimt wurden in einer konzentrationsabhängigen Weise. CpG-Oligonukleotide vom Typ A, die in hohem Maße Typ I-Interferon induzieren, hemmen die Bildung von MGC. Durch Zugabe von blockierenden Antikörpern gegen IFN- α / β /R kann das Entstehen von MGC komplett gestoppt werden. Dies weist darauf hin, dass Typ I-Interferon zur Induktion von MGC nötig ist. Die Zugabe von rekombinantem Interferon- α hemmt die MGC-Bildung. Die Anwesenheit von plasmazytoiden dendritischen Zellen hemmt die MGC-Bildung. Monozyten, die sich im Differenzierungsprozess zu MGC befinden, exprimieren die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und MHC II und reduzieren ihre CD14-Expression. Monozyten, die mit GM-CSF und Interferon- γ geprimt wurden und phagozytiert haben, sind zur CpG-induzierten Fusion zu MGC fähig. MGC exprimieren MHC I und II. MGC werden im Vergleich zu Monozyten oder Makrophagen in geringerem Maße mit *Leishmanien* infiziert. Die intrazelluläre Replikation der *Leishmanien* ist innerhalb der MGC geringer als in den Monozyten und Makrophagen.

4.2 Bewertung der Ergebnisse

4.2.1 Etablierung eines Protokolls zur Generierung von multinukleären Riesenzellen

In Übereinstimmung mit den Befunden anderer Gruppen [Enelow 1992; McNally und Anderson 1995] bildeten Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ multinukleäre Riesenzellen innerhalb von durchschnittlich 6,7 Tagen. Gibt man zusätzlich das CpG-Oligonukleotid 2006 auf Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ , so entstehen MGC schon nach durchschnittlich 2,8 Tagen. Die so entstandenen MGC weisen eine hufeisenförmige Anordnung von Zellkernen auf, die charakteristisch für multinukleäre Riesenzellen vom Langhanstyp (LGC) ist. Anfärbung der MGC im TRAP-Test zeigt, dass MGC Charakteristika der aktivierten Makrophagen aufweisen. Die Bildung von MGC ist abhängig von der Konzentration von CpG-ODN 2006. Die in früheren Studien der Arbeitsgruppe für die B-Zell-Aktivierung ermittelte CpG-ODN-Konzentration von 6 $\mu\text{g/ml}$ zeigte auch in dieser Arbeit optimale Effekte. Mit dieser Konzentration von CpG-ODN mit einem nukleaseresistenten Phosphorothioat-Rückgrat erreicht man eine zur Stimulation ausreichende Konzentration. Beim Einsatz höherer Konzentrationen von CpG-ODN macht sich der stimulierende Effekt des Phosphorothioat-Rückgrats bemerkbar, der bei Konzentrationen von 6 $\mu\text{g/ml}$ und weniger auf Hintergrundniveau liegt [Hartmann und Krieg 2000].

Beim Vergleich der Isolierungsmethoden zeigt die Negativselektion die besten Ergebnisse bezüglich der Reinheit der Monozytenpräparation und der Menge der entstandenen MGC. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Monozyten nicht markiert werden und damit ihre Oberflächenstrukturen unverändert erhalten bleiben. Die Isolierung durch Positivselektion führt zu einer etwas geringeren Reinheit der Monozytenpräparation und zu einer verringerten Ausbeute an MGC. Die Monozyten sind an ihrer CD14-Oberflächenstruktur magnetisch gelabelt. Da CD14, ein Rezeptor für Lipopolysaccharide, an der Adhärenz humaner Monozyten untereinander und somit an ihrer Fusion nach

bisherigem Erkenntnisstand nicht beteiligt ist [Most 1990; Fais 1994; Vignery 2000], kann diese Isolierungsmethode für die Generierung von MGC eingesetzt werden. Peterson et al. berichten allerdings, dass CD14 an der Fusion von Mikrogliazellen im Schwein beteiligt ist, die durch Mykobakterium bovis induziert wird [Peterson 1996].

Eine weitere Isolierungsmethode, die Aufreinigung der Monozyten unter Ausnützung ihrer Fähigkeit zur Adhärenz, zeigte sowohl in der Reinheit der Monozytenpräparation als auch bei der Ausbeute an MGC unbefriedigende Ergebnisse und wurde nicht weitergeführt.

Die Entfernung der Monozyten voneinander, bestimmt durch die Dichte des Zellrasens und der direkte Zellkontakt der Makrophagen sind von herausragender Bedeutung für die Fusion zu MGC [Fais 1994; Vignery 2000]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die verringerte Ausbeute an MGC bei der Positivselektion und der Adhärenzmethode durch die geringere Reinheit und somit geringere Dichte des Monozytenrasens im Kulturwell bedingt ist. Die Positivselektion ist kostengünstiger und weniger zeitaufwendig als die Negativselektion und kann daher für die Generierung von MGC eingesetzt werden. Sollen jedoch weitere Charakteristika der MGC untersucht werden, sollte eine mögliche Verfälschung durch markierte CD14-Oberflächenstrukturen vor der Auswahl der Isolierungsmethode in Betracht gezogen werden. Für die weiteren Untersuchungen zu Charakteristika der MGC im Hinblick auf intrazelluläre Infektionen und für Experimente mit LPS als Vergleichsbedingung wurde die Negativselektion als Isolierungsmethode gewählt.

LGC entstehen in Th1-dominierter Umgebung mit GM-CSF, Interferon- γ , Interleukin-3 [Enelow 1992; Fais 1994; McNally und Anderson 1995; Byrd 1998; Mizuno 2001], bei intrazellulären Infektionen [Gasser und Most 1999] oder in der Gegenwart von bakteriellen Bestandteilen, wie Muramyldipeptid [Mizuno 2001]. Bezüglich der Rolle von Interferon- γ in der Bildung von MGC stimmen alle Gruppen darin überein, dass es ein wichtiger Faktor für die Fusion von

Makrophagen zu MGC ist. Umstritten bleibt, ob Interferon- γ alleine zur Induktion von MGC ausreicht. Einige Studien berichten, dass Interferon- γ nötig, aber nicht ausreichend ist für die Generierung von LGC [Most 1990; Enelow 1992; Takashima 1993; McNally und Anderson 1995]. Weinberg et al. hingegen beobachten die Fusion von Makrophagen induziert durch Interferon- γ nach drei Tagen in Kultur [Weinberg 1984]. Interferon- γ induziert die Expression von verschiedener Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 [Most 1990] und ICAM-1 [Fais 1994; Anderson 2000] auf Monozyten und Makrophagen. Diese Adhäsionsmoleküle sind an der Fusion von Makrophagen zu MGC beteiligt [Most 1990; Fais 1994; Kazazi 1994; Liu 1996; Vignery 2000].

Interleukin-12 fördert die Differenzierung von CD4-positiven Zellen in Th1-Zellen, aktiviert NK-Zellen, induziert die Produktion von Interferon- γ und ist an der Th1-Immunantwort beteiligt. Interferon- γ fördert die Expression von IL-12 [Biron 2001]. Die Bildung von MGC im experimentellen Ansatz dieser Arbeit ist unabhängig von IL-12, da sie durch Zugabe von blockierenden Antikörpern gegen IL-12 nicht beeinträchtigt wurde. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit aktuellen Studien, die Interleukin-12-unabhängige Pfade für die Regulation von Th1- Antworten über IFN- γ gefunden haben [Cousens 1997; Cousens 1999].

GM-CSF hat zwar keine spezifische Funktion in der Genese von MGC, fördert diese aber indem es in vitro Stimuli ersetzt, denen die Monozyten in vivo während der Extravasation und Migration begegnen [McNally und Anderson 1995]. Zur in vitro Generierung von MGC ist GM-CSF nötig, um das Überleben, die Proliferation und die Reifung von Monozyten zu Makrophagen zu gewährleisten.

Im humanen System bilden Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ multinukleäre Riesenzellen vom Langhans-Typ innerhalb von sieben Tagen [Enelow 1992; McNally und Anderson 1995]. Die Zugabe einer Kombination von GM-CSF und Interferon- γ oder Interferon- γ und Interleukin-3 zu Monozyten, die drei Tage lang in RPMI-Medium und autologem Serum kultiviert wurden,

induzierte LGC nach sieben Tagen der Kultur [McNally und Anderson 1995]. Enelow beobachtete Makrophagenfusion mit GM-CSF und IFN- γ innerhalb einer Woche in Kultur und mit IFN- γ und IL-3 beginnend an Tag drei der Kultur mit einem Maximum zwischen 7 und 14 Tagen [Enelow 1992]. Eine schnellere Genese von MGC wurde unter dem Einfluss bakterieller Bestandteile wie Muramyldipeptid gefunden [Mizuno 2001]. Hierbei entstanden MGC bereits nach drei Tagen in Kultur. Überstände von virusinfizierten T-Zellen in Kombination mit Mykobakterium bovis Bacillus-Calmette-Guérin induzieren MGC bereits nach einem Tag in Kultur mit einer maximalen MGC-Bildung nach drei Tagen [Gasser und Most 1999]. Überstände von PBMC, die drei Tage lang mit Concanavalin A kultiviert wurden, induzierten in Monozytenpräparationen LGC nach drei Tagen in Kultur. Concanavalin A alleine induzierte LGC innerhalb von drei Tagen und die Anzahl der LGC konnte durch die Zugabe von Interferon- γ gesteigert werden [Takashima 1993]. Das CpG-Oligonukleotid 2006 induziert nach durchschnittlich 2,8 Tagen die Bildung von MGC aus Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ . Die Generierung von MGC mit GM-CSF, Interferon- γ und CpG-ODN 2006 erspart den Einsatz potentiell infektiöser Pathogene. Auf diese Weise wird auch die zeit- und materialaufwendige Herstellung von konditionierten Überständen vermieden. Die Standardisierung der Herstellungsbedingungen ist einfacher als bei Verwendung konditionierter Überstände. Außerdem werden Beeinträchtigungen der Qualität durch Einfrieren und Lagern der Überstände vermieden.

Zusammenfassend stellt die Kultur von aufgereinigten humanen Monozyten mit GM-CSF und Interferon- γ und Stimulation mit CpG-ODN 2006 eine zuverlässige und schnelle Methode zur Generierung einer großen Anzahl von MGC vom Langhans-Typ dar. Die Generierung lässt sich visuell mit oder ohne May-Grünwald/Giemsa-Färbung qualitativ gut kontrollieren und durch Ermittlung des Fusionsindex quantifizieren. In vitro ermöglicht die durch CpG-ODN induzierte beschleunigte Generierung einer großen Anzahl von multinukleären Riesenzellen weitere Studien über therapeutische Einsatzmöglichkeiten von CpG-Oligonukleotiden gegen intrazelluläre Pathogene im humanen System.

4.2.2 Die Rolle von Interferon- α in der Induktion von multinukleären Riesenzellen

Ein interessanter Befund aus den Experimenten mit Kontrolloligonukleotiden (Abb. 2) ist der Unterschied in der MGC-Induktion von CpG-ODN 2006 und CpG-ODN 2216. CpG-ODN 2006 wurde für diese Arbeit gewählt, da es ein potentes Stimulans für humane Immunzellen darstellt [Hartmann und Krieg 2000; Hartmann 2000] und sich bereits in klinischen Studien befindet [Gursel 2002]. CpG-ODN 2216 ist ein Vertreter der kürzlich beschriebenen Klasse der CpG-ODN Typ A. Diese Klasse induziert große Mengen an Typ I Interferon in plasmazytoiden dendritischen Zellen [Krug 2001a]. CpG-ODN 2216 induzierte im Gegensatz zu CpG-ODN 2006 keine MGC-Bildung. Es hemmte die Bildung von MGC in Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ . Um den unterschiedlichen Effekt der CpG-Oligonukleotide auf Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ zu erklären, wurde der Einfluss von Typ I-Interferon auf die Bildung von MGC untersucht.

Die Zugabe von blockierenden Antikörpern gegen IFN- α / β /R verhinderte die Entstehung von MGC. Typ I-Interferon ist also für die Bildung von MGC nötig. Es gibt Hinweise darauf, dass Typ I-Interferon für diverse CpG-ODN-vermittelte Effekte nötig ist, z.B. die Aktivierung von NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen über Interferon- α und - β aus CpG-ODN-stimulierten PBMC [Rothenfusser 2001a], die Aktivierung von T-Zellen durch CpG-DNA über Typ I-Interferon aus APC [Sun 2000] und die Induktion einer adaptiven Antwort auf immunstimulierende DNA in Mäusen [Van Uden 2001]. Diese Befunde führten zu der Annahme, dass CpG-ODN die Riesenzellbildung über eine Induktion von Typ I-Interferon startet und somit Typ I-Interferon der eigentliche direkte Stimulus für die Bildung von MGC darstellt. Die Zugabe von rekombinantem IFN- α hemmte jedoch die Bildung von MGC aus Monozyten, die mit GM-CSF und IFN- γ mit oder ohne Zugabe von CpG-ODN 2006 kultiviert wurden. Das zeigt die differenzierte Rolle von Typ I-Interferon in der Entstehung von MGC.

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass schon kleine Mengen von PDC (ab 0,2 % der PBMC) ausreichen, um Typ I-Interferon im Nanogrammbereich zu produzieren [Krug 2001a]. Andere Gruppen berichten, dass im humanen System auch CpG-ODN 2006 IFN- α induziert, und zwar ausreichend für die Kostimulation von T-Zellen [Bauer 1999; Kranzer 2000]. Die momentan zur Verfügung stehenden experimentellen Methoden begrenzen die Reinheit der Zellpräparationen. Die Monozytenpräparationen in dieser Arbeit enthielten Konzentrationen an PDC von 0 bis 1 % der Zellzahl. Die Aufreinigung der Monozyten durch magnetische Markierung kann zu einer Anreicherung von PDC innerhalb der aufgereinigten Monozytenpräparation führen [Krug 2001a]. Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Typ I-Interferon aus PDC in den Monozytenpräparationen für die Induktion von MGC verantwortlich ist. Monozytenpräparationen mit einem hohen Gehalt an PDC zeigten aber eine verminderte Fusion zu Monozyten verglichen mit den Präparationen, die wenig PDC enthielten. Die Bildung von MGC wurde auch in Monozytenpräparationen mit weniger als 0,01 % PDC gefunden.

Zusammenfassend ergibt sich, dass eine geringe Menge an Typ I-Interferon zur Induktion von MGC nötig ist, große Mengen an Typ I-Interferon aber die MGC-Bildung hemmen. Biron et al. postulieren, dass die Menge an Typ I-Interferon, die aufgrund einer Infektion initial induziert wird, die Art der Immunantwort bestimmt [Biron 2001]: Wenig Typ I-Interferon führt zu Th1-gerichteter Immunantwort. Viel Typ I-Interferon hingegen führt über positiven Feedback zu weiterer Produktion von Typ I-Interferon, Hemmung von Interleukin-12 [Cousens 1997], Aktivierung von NK-Zellen und Expansion der CD8-T-Zellen als Antwort auf sich ausbreitende virale Infektionen (Abb. VI).

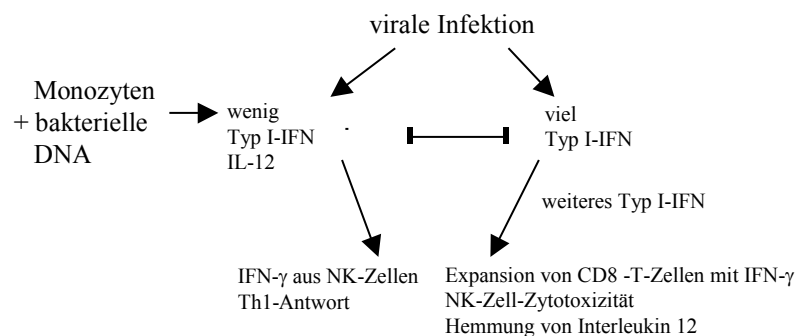


Abb. VI: Die Menge an induziertem Typ I-Interferon bestimmt die Art der Immunantwort auf virale und intrazelluläre Infektionen
[Cousens 1997; Biron 2001]

In vivo entstehen Situationen mit wenig Typ I-Interferon bei Infektionen mit nicht viralen Agenzien, Infektionen mit Viren, die wenig Typ I-Interferon induzieren und Virusinfektionen, die bereits unter Kontrolle sind. Hier beschränkt sich die Produktion von Typ I-Interferon auf wenige Initialzellen, vor allem dendritische Zellen. Interleukin-12 und Typ I-Interferon führen in diesem Fall synergistisch zu einer vermehrten Produktion von IFN- γ in Th1-Zellen.

CpG-ODN vom Typ A induzieren in PDC in hohem Maße die Produktion von Typ I-Interferon, also eine Situation mit viel Typ I-Interferon. CpG-ODN Typ A imitieren eine virale Infektion und induzieren eine adäquate Immunantwort [Krug 2001a]. Die DNA-Sequenz von Typ A-Oligonukleotiden stellt ein molekulares Muster dar, das vom Immunsystem von Wirbeltieren als virale DNA interpretiert wird, dem natürlichen Stimulus für Typ I-Interferon [Krug 2001a]. Im experimentellen Ansatz dieser Arbeit induzierte CpG-ODN 2216 nicht die Bildung von MGC und hemmte sogar die MGC-Bildung, die durch GM-CSF und Interferon- γ induziert wird. MGC spielen eine Rolle in der Begrenzung von intrazellulären, vesikulären Pathogenen. Das führt zu der Hypothese, dass CpG-ODN 2006 eine intrazelluläre Infektion nachahmt und einen anderen

Differenzierungsweg für Monozyten triggert als virale Infektionen. CpG-ODN 2006 imitiert die Situation mit wenig Typ I-Interferon.

CpG-ODN A und B triggern konkurrierende Signalwege in Monozyten. Gursel et al. postulieren eine gegenseitige Hemmung der Effekte von Typ A- und Typ B-Oligonukleotiden auf Monozyten [Gursel 2002]. Es ist denkbar, dass CpG-ODN 2006 auch andere Differenzierungswege hemmt, zum Beispiel die durch GM-CSF und Interleukin-4 induzierte Differenzierung in myeloide dendritische Zellen oder die vor kurzem beschriebene Differenzierung von Monozyten in GM-CSF/CpG-ODN-2216-induzierte dendritische Zellen, die die Bildung von CD8-T-Zellen fördert [Krug 2003].

4.2.3 Eigenschaften der multinukleären Riesenzellen hinsichtlich intrazellulärer Infektionen

Aufgrund der Annahme, dass CpG-ODN 2006 die Monozyten in einen Differenzierungsweg zu Immunzellen gegen intrazelluläre Infektionen lenkt, erscheint es sinnvoll, die Eigenschaften von CpG-ODN 2006-induzierten MGC hinsichtlich intrazellulärer Infektionen zu untersuchen.

In vivo kommen Riesenzellen vom Langhans-Typ bei granulomatösen Erkrankungen verschiedener Genese vor, in Infektionskrankheiten wie Tuberkulose, Lepra oder Schistosomiasis, in chronischen Entzündungen wie rheumatoide Arthritis und Morbus Crohn [Liu 1996] oder in Erkrankungen unbekannter Genese wie Sarkoidose. Ihre Funktion ist noch weitgehend unbekannt. Häufig zeigt die fehlende Granulom- und MGC-Bildung eine ineffektive Immunabwehr an, wie zum Beispiel bei den disseminierten Formen von Tuberkulose, Leishmaniose, Coccidiomycosis, Histoplasmosis, bei lepromatöser Lepra oder Mykobakterium avium-Infektionen bei AIDS-Patienten [Enelow 1992; Fenton und Vermeulen 1996].

Die Expression von MHC I und II und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sind Voraussetzungen für Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen durch das mononukleäre phagozytäre System. Einige Gruppen berichten, dass CpG-ODN die Expression von MHC I und II auf Monozyten vermindert [Chu 1999; Ramachandra 1999]. Andere Gruppen zeigen eine vermehrte Expression von CD86, MHC I und II induziert durch CpG-Oligonukleotide in aufgereinigten humanen Monozytenpräparationen [Bauer 1999]. In dieser Arbeit exprimierten Monozyten, die mit GM-CSF und Interferon- γ kultiviert wurden CD80, CD86 und MHC II. Die Stimulation mit CpG-ODN 2006 erhöhte die Expression dieser Oberflächenmarker nicht signifikant. Monozyten im Differenzierungsprozess zu MGC exprimieren also die zur Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen nötigen Oberflächenmoleküle. Multinukleäre Riesenzellen, die durch GM-CSF, IFN- γ und CpG-ODN 2006 induziert wurden, exprimierten auf ihrer Oberfläche CD80, CD86, MHC I und II, sind also ebenfalls zur Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung fähig. Einige Studien berichten, dass multinukleäre Riesenzellen MHC II und kostimulatorische Moleküle exprimieren, aber wenig phagozytieren [Mariano und Spector 1974; Papadimitriou und Walters 1979].

MGC phagozytieren bakterielle Antigene wie Mykobakterium tuberculosis, aber in geringerem Ausmaß verglichen mit mononukleären Phagozyten [Fais 1997]. MAK-Zellen, also Makrophagen, die mit IFN- γ oder LPS stimuliert wurden, sind im Vergleich zu primären Monozyten stark phagozytierend [Oberling 1997; Wallace 2000]. In dieser Arbeit phagozytierten Monozyten in Kultur mit GM-CSF, IFN- γ und CpG-ODN 2006 Latexbeads in großem Ausmaß und fusionierten dann zu MGC. Die Zugabe von Latexbeads zu vier Tage alten Kulturen von Monozyten in GM-CSF, IFN- γ und CpG-ODN 2006, zu einem Zeitpunkt also, wenn schon MGC vorhanden waren, führte ebenfalls zur Entstehung von MGC. Monozyten, die phagozytiert haben, waren also noch befähigt, zu MGC zu fusionieren.

Die Fähigkeit zur Zellfusion geht während der Reifung von Monozyten zu Makrophagen langsam verloren. Monozyten können aber noch mit Makrophagen fusionieren [Chambers 1977; Most 1997; Seitzer 2001]. Direkter Kontakt zu Mykobakterien reicht als alleiniger Stimulus zur Induktion der Fusion zu MGC aus, Phagozytose alleine hingegen nicht [Gasser und Most 1999].

Es wurde gezeigt, dass Monozyten eine größere Kapazität haben als Makrophagen, intrazelluläre Mikroorganismen zu töten [Weinberg 1985]. Die Fusion von neu an der Infektionsstelle eintreffenden Monozyten mit infizierten Monozyten oder Makrophagen könnte also die Fähigkeit wiederherstellen, Pathogene zu töten [Fais 1997; Most 1997; Gasser und Most 1999]. So konnten Byrd et al. zeigen, dass humane Monozyten, die mit IFN- γ und IL-3 kultiviert und mit Mykobakterium tuberculosis infiziert wurden, MGC bildeten und das Wachstum der Mykobakterien hemmten [Byrd 1998]. Der Mechanismus der MGC-Bildung durch Fusion legt die Hypothese nahe, dass MGC ein fortdauerndes Reservoir für Antigene und infektiöse Agenzien darstellen, sozusagen einen ganzen Pool von Antigenen. MGC können Pathogene intrazellulär einschließen, die Antigene über MHC- Moleküle den Lymphozyten präsentieren, gleichzeitig die kostimulatorischen Signale liefern – und das alles, ohne die infektiösen Agenzien in die Umgebung zu verteilen. Pathogene innerhalb der MGC werden durch Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff und durch Kalzifizierung innerhalb des Granuloms abgetötet [Byrd 1998].

Im experimentellen Ansatz dieser Arbeit wurden mononukleäre Makrophagen unabhängig von der Kulturbedingung zu 70 bis 80 Prozent von Leishmanien infiziert. Im weiteren Kulturverlauf erfolgt keine Neuinfektion von nicht infizierten Makrophagen. Die Leishmanien replizieren sich jedoch innerhalb der Makrophagen in hohem Ausmaß, unabhängig von der Kulturbedingung. Die durch die Stimuli Interferon- γ und CpG-ODN 2006 induzierten Abwehrmechanismen über kostimulatorische und antigenpräsentierende Moleküle greifen im Monozellsystem des experimentellen Ansatzes dieser

Arbeit nicht, weil keine Lymphozyten vorhanden sind, die eine Aktivierung der Makrophagen oder eine Th1-gerichtete Immunantwort vermitteln können.

Im weiteren Verlauf einer Infektion in vivo werden infizierte Makrophagen von aktivierten Makrophagen getötet. MGC zeigten sich resistenter gegen Infektion mit *Leishmania major* als Makrophagen, was vor allem durch die verminderte Phagozytosefähigkeit der MGC zu erklären ist. Leishmanien interagieren mit dem Komplementrezeptor CR3 und werden durch Phagozytose in die Makrophagen internalisiert [Schonlau 2000].

Innerhalb der MGC wurde im Gegensatz zu Makrophagen keine Replikation der Parasiten beobachtet. MGC können die Replikation von intrazellulären Pathogenen also ohne die Hilfe akzessorischer Zellen hemmen, möglicherweise durch Nährstoff- und Sauerstoffentzug. CpG-ODN 2006 kann die Ausbreitung einer intrazellulären Infektion durch Induktion von MGC hemmen.

4.3 Klinische Relevanz und Ausblick

CpG-Oligonukleotide können Mäuse gegen bakterielle, virale und parasitäre Infektionen schützen. Einige Pathogene, vor allem solche, die Langzeitinfektionen auslösen, weisen eine Suppression von CpG-Motiven in ihrem Genom auf [Krieg 2002]. Die Therapie mit synthetischen CpG-Oligonukleotiden könnte in diesem Fall eine geeignete Immunantwort wiederherstellen. Das humane CpG-ODN 2006 befindet sich bereits in klinischen Studien als Adjuvans bei Hepatitis B-Impfungen. Im Zuge der Einsetzbarkeit im humanen System ist der Effekt der Induktion von multinukleären Riesenzellen von Bedeutung.

Die Leishmanien-Forschung hat in letzter Zeit an Bedeutung gewonnen. Die Suche nach effizienten, verträglichen, breit einsetzbaren und kostengünstigen Prophylaxe- und Therapiemöglichkeiten zur Verminderung der Morbidität und

Sterblichkeit durch Leishmaniosen steht an erster Stelle. Angesichts von etwa 350 Millionen gefährdeter Menschen in den Endemiegebieten mit geschätzten 1,5 Millionen Neuinfektionen pro Jahr und der vermehrten Ausbreitung der Infektion auch auf bisher nicht betroffene Gebiete durch Reisende und Migranten besteht Handlungsbedarf (WHO). Kriegseinsätze und Friedensmissionen in Endemiegebieten [Magill 1993; Hewitt 1998] stellen eine Gefahr für die dort eingesetzten Soldaten dar. Leishmaniosen haben auch als AIDS-assoziierte opportunistische Infektionskrankheiten an Bedeutung gewonnen. Experimentelle Leishmaniosemodelle finden vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in Studien zur Immunantwort auf intrazelluläre Infektionen [Reed und Scott 1993; Sacks 1998; Herwaldt 1999].

Multinukleäre Riesenzellen, die mit dem in dieser Arbeit etablierten Protokoll generiert werden, können in Kombination mit dem Leishmanienmodell für weitere Studien intrazellulärer Infektionen einschließlich Antigenpräsentation, Th1/Th2 – Paradigma und Killingassays intrazellulärer Pathogene durch aktivierte Makrophagen im humanen System genutzt werden. Außerdem erscheint ein Einsatz von CpG-generierten MGC auch in der Erforschung anderer Infektionskrankheiten wie Tuberkulose, Schistosomiasis oder Mykoplasmen sinnvoll.

5. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit steht erstmals ein Protokoll zur beschleunigten Generierung einer großen Anzahl von multinukleären Riesenzellen zur Verfügung. Es wurde gezeigt, dass das humane CpG-Oligonukleotid 2006 konzentrationsabhängig die Bildung von multinukleären Riesenzellen fördert. Die so generierten Riesenzellen sind in der Lage, die intrazelluläre Replikation von *Leishmania major* zu kontrollieren.

Die Anwesenheit von Interferon- α ist dabei in geringen Konzentrationen notwendig; rekombinantes Interferon- α hingegen kann alleine keine MGC induzieren.

Die zwei unterschiedlichen Klassen von CpG-Oligonukleotiden, CpG-ODN vom Typ A und CpG-ODN vom Typ B, lenken in der vorliegenden Arbeit humane periphere Monozyten in verschiedene Differenzierungswege, je nach Art der Infektion, die sie nachahmen. So wird das Typ B-Oligonukleotid 2006 vom Immunsystem des Wirbeltiers als Signal einer intrazellulären Infektion erkannt und fördert die Differenzierung von Monozyten in Kultur mit GM-CSF und Interferon- γ in multinukleäre Riesenzellen, die zu einer koordinierten Immunantwort gegen intrazelluläre Infektionen beitragen.

CpG-induzierte multinukleäre Riesenzellen und Monozyten auf dem Differenzierungsweg zu MGC exprimieren kostimulatorische und antigenpräsentierende Moleküle und zeigen Charakteristika von aktivierten Makrophagen. CpG-induzierte multinukleären Riesenzellen lassen sich mit *Leishmanien* infizieren. Die intrazelluläre Replikation von *Leishmania major* innerhalb der multinukleären Riesenzellen ist jedoch wesentlich geringer als in mononukleären Monozyten und Makrophagen. Diese Arbeit bildet die Grundlage für eine weiterführende funktionelle Analyse vom multinukleären Riesenzellen.

6. Literatur

- Aderem, A., Hume, D.A. (2000). How do you see CG? *Cell* **103**: 993-996.
- Aderem, A. und Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**(6797): 782-7.
- Akira, S., Takeda, K., et al. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**(8): 675-80.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., et al. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**(6857): 732-8.
- Anderson, J. M. (2000). Multinucleated giant cells. *Curr Opin Hematol* **7**(1): 40-7.
- Andreesen, R., Hennemann, B., et al. (1998). Adoptive immunotherapy of cancer using monocyte-derived macrophages: rationale, current status, and perspectives. *J Leukoc Biol* **64**(4): 419-26.
- Banzer, J. (2002). Leishmaniose - Eine alte Krankheit gerät in Erinnerung. *Apothekenjournal*(8/9): 28/29.
- Bartholeyns, J., Bardot, V., et al. (2000). [Adoptive immunotherapy: evaluation and perspectives in the treatment of certain cancers]. *Rev Med Interne* **21**(10): 863-71.
- Bauer, M., Heeg, K., et al. (1999). DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner. *Immunology* **97**(4): 699-705.
- Bauer, S., Kirschning, C. J., et al. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16): 9237-42.
- Belkaid, Y., Butcher, B., et al. (1998). Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in Leishmania-infected cells. *Eur J Immunol* **28**(4): 1389-400.
- Bernier, R., Barbeau, B., et al. (1998). The lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor-kappaB elements. *J Immunol* **160**(6): 2881-8.

-
- Biron, C. A. (2001). Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* **14**(6): 661-4.
- Brazolot Millan, C. L., Weeratna, R., et al. (1998). CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15553-8.
- Brunner, C., Seiderer, J., et al. (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.
- Byrd, T. F. (1998). Multinucleated giant cell formation induced by IFN-gamma/IL-3 is associated with restriction of virulent Mycobacterium tuberculosis cell to cell invasion in human monocyte monolayers. *Cell Immunol* **188**(2): 89-96.
- Chambers, T. J. (1977). Failure of altered macrophage surface to lead to the formation of polykaryons. *J Pathol* **122**(4): 185-9.
- Chu, R. S., Askew, D., et al. (1999). CpG oligodeoxynucleotides down-regulate macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol* **163**(3): 1188-94.
- Chu, R. S., Targoni, O. S., et al. (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* **186**(10): 1623-31.
- Coley, W. B. (1893). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* **105**: 487-511.
- Corral, R. S. und Petray, P. B. (2000). CpG DNA as a Th1-promoting adjuvant in immunization against *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine* **19**(2-3): 234-42.
- Cousens, L. P., Orange, J. S., et al. (1997). Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(2): 634-9.
- Cousens, L. P., Peterson, R., et al. (1999). Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell

- interferon gamma responses during viral infection. *J Exp Med* **189**(8): 1315-28.
- Davis, H. L., Suparto, II, et al. (2000). CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* **18**(18): 1920-4.
- Davis, H. L., Weeratna, R., et al. (1998). CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* **160**(2): 870-6.
- DeFife, K. M., Jenney, C. R., et al. (1997). Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression. *J Immunol* **158**(7): 3385-90.
- Eischen, A., Vincent, F., et al. (1991). Long term cultures of human monocytes in vitro. Impact of GM-CSF on survival and differentiation. *J Immunol Methods* **143**(2): 209-21.
- Elkins, K. L., Rhinehart-Jones, T. R., et al. (1999). Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol* **162**(4): 2291-8.
- Enelow, R. I., Sullivan, G. W., et al. (1992). Induction of multinucleated giant cell formation from in vitro culture of human monocytes with interleukin-3 and interferon-gamma: comparison with other stimulating factors. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**(1): 57-62.
- Fais, S., Burgio, V. L., et al. (1997). The biological relevance of polykaryons in the immune response. *Immunol Today* **18**(11): 522-7.
- Fais, S., Burgio, V. L., et al. (1994). Multinucleated giant cells generation induced by interferon-gamma. Changes in the expression and distribution of the intercellular adhesion molecule-1 during macrophages fusion and multinucleated giant cell formation. *Lab Invest* **71**(5): 737-44.
- Fenton, M. J. und Vermeulen, M. W. (1996). Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* **64**(3): 683-90.
- Freidag, B. L., Melton, G. B., et al. (2000). CpG oligodeoxynucleotides and interleukin-12 improve the efficacy of Mycobacterium bovis BCG vaccination in mice challenged with M. tuberculosis. *Infect Immun* **68**(5): 2948-53.

-
- Gasser, A. und Most, J. (1999). Generation of multinucleated giant cells in vitro by culture of human monocytes with *Mycobacterium bovis* BCG in combination with cytokine-containing supernatants. *Infect Immun* **67**(1): 395-402.
- Gramzinski, R. A., Doolan, D. L., et al. (2001). Interleukin-12- and gamma interferon-dependent protection against malaria conferred by CpG oligodeoxynucleotide in mice. *Infect Immun* **69**(3): 1643-9.
- Gursel, I., Gursel, M., et al. (2001). Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides. *J Immunol* **167**(6): 3324-8.
- Gursel, M., Verthelyi, D., et al. (2002). Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J Leukoc Biol* **71**(5): 813-20.
- Halperin, S. A., Van Nest, G., et al. (2003). A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with a immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine*(21): 2461-2467.
- Hartmann, G. und Krieg, A. M. (1999). CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther* **6**(5): 893-903.
- Hartmann, G. und Krieg, A. M. (2000). Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* **164**(2): 944-53.
- Hartmann, G., Krug, A., et al. (1998). Spontaneous and cationic lipid-mediated uptake of antisense oligonucleotides in human monocytes and lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **285**: 920-8.
- Hartmann, G., Krug, A., et al. (1996). Oligodeoxynucleotides enhance lipopolysaccharide-stimulated synthesis of tumor necrosis factor: dependence on phosphorothioate modification and reversal by heparin. *Mol Med* **2**(4): 429-38.
- Hartmann, G., Weeratna, R. D., et al. (2000). Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* **164**(3): 1617-24.

-
- Hartmann, G., Weiner, G. J., et al. (1999). 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.
- Hausser, G., Ludewig, B., et al. (1997). Monocyte-derived dendritic cells represent a transient stage of differentiation in the myeloid lineage. *Immunobiology* **197**(5): 534-42.
- Hayashi, F., Smith, K. D., et al. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**(6832): 1099-103.
- Hemmi, H., Kaisho, T., et al. (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., Takeuchi, O., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**(6813): 740-5.
- Hepburn, N. C. (2000). Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* **25**(5): 363-70.
- Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet* **354**(9185): 1191-9.
- Hewitt, S., Reyburn, H., et al. (1998). Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: vertical distribution of cases in apartment blocks. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**(3): 273-4.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., et al. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**: 1313-8.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., et al. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **168**(9): 4531-7.
- Jahrsdorfer, B., Hartmann, G., et al. (2001). CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol* **69**(1): 81-8.
- Janckila, A. J., Takahashi, K., et al. (2001). Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clin Chem* **47**(1): 74-80.
- Janeway (1999). Immunobiology.

-
- Jones, T. R., Obaldia, N., 3rd, et al. (1999). Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys. *Vaccine* **17**(23-24): 3065-71.
- Juffermans, N. P., Leemans, J. C., et al. (2002). CpG oligodeoxynucleotides enhance host defense during murine tuberculosis. *Infect Immun* **70**(1): 147-52.
- Karlin, S., Ladunga, I., et al. (1994). Heterogeneity of genomes: measures and values. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26): 12837-41.
- Kazazi, F., Chang, J., et al. (1994). Interleukin 4 and human immunodeficiency virus stimulate LFA-1-ICAM-1-mediated aggregation of monocytes and subsequent giant cell formation. *J Gen Virol* **75**(Pt 10): 2795-802.
- Klinman, D. M., Kamstrup, S., et al. (2000). Activation of the innate immune system by CpG oligodeoxynucleotides: immunoprotective activity and safety. *Springer Semin Immunopathol* **22**(1-2): 173-83.
- Klinman, D. M., Verthelyi, D., et al. (1999). Immune recognition of foreign DNA: a cure for bioterrorism? *Immunity* **11**(2): 123-9.
- Kranzer, K., Bauer, M., et al. (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. und Davis, H. L. (2001). Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA. *Curr Opin Mol Ther* **3**(1): 15-24.
- Krieg, A. M., Hartmann, G., et al. (2000). Mechanism of action of CpG DNA. *Curr Top Microbiol Immunol* **247**: 1-21.
- Krieg, A. M., Love-Homan, L., et al. (1998). CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* **161**(5): 2428-34.
- Krieg, A. M. und Wagner, H. (2000). Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunol Today* **21**(10): 521-526.

-
- Krieg, A. M., Yi, A. K., et al. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**: 546-9.
- Krug, A., Rothenfusser, S., et al. (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., et al. (2003). CpG-A oligonucleotides induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells. *J Immunol* **170**(7): 3468-77.
- Krug, A., Towarowski, A., et al. (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.
- Kumar, P. J. und Clark, M. L. (1990). Clinical Medicine. London, Bailliere Tindall.
- Langhans, T. (1868). Ueber Riesenzellen mit wandständigen Kernen in Tuberkeln und die fibröse Form des Tuberkels. *Virschows Arch. Pathol. Anat.*(42): 382-404.
- Lipford, G. B., Bauer, M., et al. (1997a). 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., Sparwasser, T., et al. (1997b). Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur J Immunol* **27**(12): 3420-6.
- Liu, H. M., Newbrough, S. E., et al. (1998). Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides enhance the immune response to vaccine strategies involving granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **92**(10): 3730-6.
- Liu, Z. X., Noguchi, M., et al. (1996). Monocyte aggregation and multinucleated giant-cell formation in vitro in Crohn's disease. The effect of cell adhesion molecules. *Scand J Gastroenterol* **31**(7): 706-10.
- Lopez, M., Bony, V., et al. (1996). Tumoricidal potential of human macrophages grown in vitro from blood monocytes. *J Exp Ther Oncol* **1**(3): 143-54.

-
- Lopez, M., Martinache, C., et al. (1993). Autologous lymphocytes prevent the death of monocytes in culture and promote, as do GM-CSF, IL-3 and M-CSF, their differentiation into macrophages. *J Immunol Methods* **159**(1-2): 29-38.
- Macfarlane, D. E. und Manzel, L. (1998). Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol* **160**(3): 1122-31.
- Machado-Pinto, J., Pinto, J., et al. (2002). Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. *Int J Dermatol* **41**(2): 73-8.
- Magill, A. J., Grogl, M., et al. (1993). Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. *N Engl J Med* **328**(19): 1383-7.
- Manzel, L. und Macfarlane, D. E. (1999). Lack of immune stimulation by immobilized CpG-oligodeoxynucleotide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **9**(5): 459-64.
- Mariano, M. und Spector, W. G. (1974). The formation and properties of macrophage polykaryons (inflammatory giant cells). *J Pathol* **113**(1): 1-19.
- McCluskie, M. J., Weeratna, R. D., et al. (2001). The potential of oligodeoxynucleotides as mucosal and parenteral adjuvants. *Vaccine* **19**(17-19): 2657-60.
- McNally, A. K. und Anderson, J. M. (1995). Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *Am J Pathol* **147**(5): 1487-99.
- Mizuno, K., Okamoto, H., et al. (2001). Muramyl dipeptide and mononuclear cell supernatant induce Langhans-type cells from human monocytes. *J Leukoc Biol* **70**(3): 386-94.
- Modabber, F. (1995). Vaccines against leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* **89**(Suppl 1): 83-8.

-
- Moldoveanu, Z., Love-Homan, L., et al. (1998). CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine* **16**(11-12): 1216-24.
- Most, J., Neumayer, H. P., et al. (1990). Cytokine-induced generation of multinucleated giant cells in vitro requires interferon-gamma and expression of LFA-1. *Eur J Immunol* **20**(8): 1661-7.
- Most, J., Spötl, L., et al. (1997). Formation of multinucleated giant cells in vitro is dependent on the stage of monocyte to macrophage maturation. *Blood* **89**(2): 662-71.
- Oberling, F. (1997). Monocyte/macrophages as effector cells in cancer immunotherapy. *Transfus Sci* **18**(2): 243-50.
- Oxenius, A., Martinic, M. M., et al. (1999). CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines. *J Virol* **73**(5): 4120-6.
- Papadimitriou, J. M. und Walters, M. N. (1979). Macrophage polykaryon. *CRC Crit Rev Toxicol* **6**(3): 211-55.
- Paquette, R. L., Hsu, N. C., et al. (1998). Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* **64**(3): 358-67.
- Peterson, P. K., Gekker, G., et al. (1996). Multinucleated giant cell formation of swine microglia induced by Mycobacterium bovis. *J Infect Dis* **173**(5): 1194-201.
- Ramachandra, L., Chu, R. S., et al. (1999). Phagocytic antigen processing and effects of microbial products on antigen processing and T-cell responses. *Immunol Rev* **168**: 217-39.
- Reed, S. G. und Scott, P. (1993). T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr Opin Immunol* **5**(4): 524-31.
- Roman, M., Martin-Orozco, E., et al. (1997). Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med* **3**(8): 849-54.

-
- Romani, N., Reider, D., et al. (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* **196**(2): 137-51.
- Rothenfusser, S., Hornung, V., et al. (2001a). Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/beta. *Eur J Immunol* **31**(12): 3525-34.
- Rothenfusser, S., Jahrsdorfer, B., et al. (2001b). CpG-Oligonukleotide : Immuntherapie nach dem Muster bakterieller DNA. *Deutsches Ärzteblatt*(15): A-981.
- Sacks, P. C. M. a. D. L. (1998). Animal models for the analysis of immune responses to Leishmaniasis. *Current Protocols in Immunology* **Chapter 19**(Unit 2): 1 - 20.
- Sallusto, F. und Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**(4): 1109-18.
- Santini, S. M., Lapenta, C., et al. (2000). Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* **191**(10): 1777-88.
- Schonlau, F., Scharffetter-Kochanek, K., et al. (2000). In experimental leishmaniasis deficiency of CD18 results in parasite dissemination associated with altered macrophage functions and incomplete Th1 cell response. *Eur J Immunol* **30**(9): 2729-40.
- Seitzer, U., Haas, H., et al. (2001). A human in vitro granuloma model for the investigation of multinucleated giant cell and granuloma formation. *Histol Histopathol* **16**(2): 645-53.
- Siegenthaler, W. (1994). Klinische Pathophysiologie. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- Stacey, K. J. und Blackwell, J. M. (1999). Immunostimulatory DNA as an adjuvant in vaccination against *Leishmania major*. *Infect Immun* **67**(8): 3719-26.

-
- Stacey, K. J., Sweet, M. J., et al. (1996). Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* **157**(5): 2116-22.
- Sun, S., Zhang, X., et al. (2000). Multiple effects of immunostimulatory DNA on T cells and the role of type I interferons. *Springer Semin Immunopathol* **22**(1-2): 77-84.
- Takashima, T., Ohnishi, K., et al. (1993). Differential regulation of formation of multinucleated giant cells from concanavalin A-stimulated human blood monocytes by IFN-gamma and IL-4. *J Immunol* **150**(7): 3002-10.
- Takeshita, F., Leifer, C. A., et al. (2001). Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol* **167**(7): 3555-8.
- Tokunaga, T., Yamamoto, H., et al. (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.
- Van Uden, J. H., Tran, C. H., et al. (2001). Type I interferon is required to mount an adaptive response to immunostimulatory DNA. *Eur J Immunol* **31**(11): 3281-90.
- Verthelyi, D., Kenney, R. T., et al. (2002). CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates. *J Immunol* **168**(4): 1659-63.
- Vignery, A. (2000). Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol* **81**(5): 291-304.
- Wagner, H. (1999). Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* **73**: 329-68.
- Walker, P. S., Scharon-Kersten, T., et al. (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, P. K., Romet-Lemonne, J. L., et al. (2000). Production of macrophage-activated killer cells for targeting of glioblastoma cells with bispecific antibody to FcγRI and the epidermal growth factor receptor. *Cancer Immunol Immunother* **49**(9): 493-503.

-
- Weighardt, H., Feterowski, C., et al. (2000). Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J Immunol* **165**(8): 4537-43.
- Weinberg, J. B., Hobbs, M. M., et al. (1984). Recombinant human gamma-interferon induces human monocyte polykaryon formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(14): 4554-7.
- Weinberg, J. B., Hobbs, M. M., et al. (1985). Phenotypic characterization of gamma interferon-induced human monocyte polykaryons. *Blood* **66**(6): 1241-6.
- Weiner, G. J., Liu, H. M., et al. (1997). Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20): 10833-7.
- Yamamoto, S., Yamamoto, T., et al. (1992). DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol* **36**: 983-97.
- Yamamoto, T., Yamamoto, S., et al. (1994). Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Jpn J Cancer Res* **85**: 775-9.
- Yaziji, H., Janckila, A. J., et al. (1995). Immunohistochemical detection of tartrate-resistant acid phosphatase in non-hematopoietic human tissues. *Am J Clin Pathol* **104**(4): 397-402.
- Zimmermann, S., Egeter, O., et al. (1998). CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* **160**(8): 3627-30.
- Zou, W., Borvak, J., et al. (2000). Macrophage-derived dendritic cells have strong Th1-polarizing potential mediated by beta-chemokines rather than IL-12. *J Immunol* **165**(8): 4388-96.
- Zou, W., Hakim, I., et al. (2001). Tumor necrosis factor-alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. *J Cell Biochem* **83**(1): 70-83.

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb. (3 ⁶)	Abbildung
AIDS (64)	<i>Aquired immune deficiency syndrome</i>
Anti-IFN- α / β /R (25)	Cocktail aus blockierenden Antikörpern gegen Interferon- α , Interferon- β und die Interferon- α -Rezeptorkette 2
AP (8)	Adapterprotein
BALB/c (16)	Bagg albino/c (Mausstamm)
BCG (1)	Bacillus Calmette Guérin
BDCA-4 (24)	<i>Blood dendritic cell antigen-4</i>
CD (4)	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L (5)	CD40-Ligand
CpG (2)	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
CpG-A (5)	CpG-Oligonukleotid vom Typ A
CpG-B (5)	CpG-Oligonukleotid vom Typ B
CpG-DNA (3)	DNA mit CpG-Motiven
CpG-ODN (2)	CpG-Oligodesoxynukleotide
CTL (6)	Zytotoxischer T-Lymphozyt
DC (8)	Dendritische Zelle
DNA (1)	Desoxyribonukleinsäure
EDTA (20)	Ethylendiamintetraacetat
EKG (20)	Elektrokardiogramm
ELISA (19)	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK (8)	<i>Extracellular receptor kinase</i>
FACS (29)	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS (23)	Fetales Kälberserum
FI (26)	Fusionsindex
FITC (29)	Fluorescein-Isotiozyanat
FSC (28)	Vorwärtsstreulicht
GM-CSF (10)	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

⁶ Seitenzahl der erstmaligen Erwähnung

High-PDC (17)	Monozytenpräparation mit PDC-Gehalt > 0,2%
HIV (15)	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA (24)	<i>Human lymphocyte antigen</i>
ICAM (4)	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN (1)	Interferon
Ig (5)	Immunglobulin
IKK (8)	I κ B-Kinase-Komplex
IL (6)	Interleukin
IRAK (8)	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
JNK (8)	<i>C-jun N-terminal kinase</i>
L. (17)	Leishmania
LAL (25)	Limulus-Amöbozytenlysate
LFA (59)	<i>Lymphocyte function-associated antigen</i>
LGC (11)	Multinukleäre Riesenzellen vom Langhans-Typ
Low-PDC (17)	Monozytenpräparation mit PDC-Gehalt < 0,02%
LPS (3)	Lipopolysaccharid
mAb (9)	Monoklonaler Antikörper
MACS (20)	Magnetische Zellsortierung
MAK (10)	Aktivierte Killermakrophagen
M-CSF (12)	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MDC (4)	Myeloide dendritische Zellen
MFI (29)	Mittlere Fluoreszenzintensität
MGC (11)	Multinukleäre Riesenzellen
MHC (4)	<i>Major histocompatibility complex</i>
MyD88 (8)	<i>Myeloid differentiation marker 88</i>
n (37)	Fallzahl
NF- κ B (8)	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen (4)	Natürliche Killerzellen
ODN (1)	Oligodesoxynukleotid
p38 (8)	Protein 38
PBMC (20)	Mononukleäre Zellfraktion des peripheren Blutes
PBS (20)	Phosphatgepufferte physiologische Salzlösung
PCR (20)	<i>Polymerase chain reaction</i>

PDC (4)	Plasmazytoide dendritische Zellen
PE (21)	Phycoerythrin
PerCP (21)	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PKR (8)	Doppelstrang-RNA-aktivierte Proteinkinase
PRR (7)	<i>Pattern recognition receptor</i>
RANKL (12)	<i>Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand</i>
SEM (33)	Standardfehler des Mittels
SSC (28)	Seitwärtsstreulicht
Tab. (2)	Tabelle
TCR (6)	T-Zell-Rezeptor
Th (5)	T-Helferzelle
TIRAP (8)	<i>TIR domain-containing adapter protein</i>
TLR (7)	<i>Toll-like receptor</i>
TRAF6 (8)	TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6
TRAP (27)	Tartratresistente saure Phosphatase
Typ I-IFN (5)	Interferon- α und Interferon- β
WHO (20)	World health organisation

Veröffentlichungen

A. Originalartikel:

Krug, A., Rothenfusser, S., Selinger, S., Bock, C., Kerkmann, M., Battiany, J., Sarris, A., Giese, T., Speiser, D., Endres, S., und Hartmann, G., CpG-A ODN induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells. *J.Immunol.*, 2003 Apr.1 170(7); 3468-77

Bock, C., von Stebut, E., Krug, A., Rothenfusser, S., Sarris, A., Kerkmann, M., Endres, S., und Hartmann, G., CpG oligonucleotides drive human monocytes primed with GM-CSF and interferon- γ towards Langhans multinucleated giant cells which resist *Leishmania major* replication. *Manuskript in Vorbereitung*

B. Forschungsberichte:

Bock, C., Krug, A., Selinger, S., Rothenfusser, S., Jahrsdoerfer, B., Bar-Shavit, Z.¹, Endres, S., und Hartmann, G., ¹the Humbert Humphrey Center for Cancer Research, The Hebrew University, Jerusalem, Israel. Human monocytes primed with GM-CSF and IFN- γ form multinucleated giant cells in response to CpG-ODN. *Final Scientific Research Report, 2001, Research Grant of the German Israeli Foundation for Scientific Research and Development*

C. Vorträge und Poster:

Human monocytes primed with GM-CSF and IFN- γ form multinucleated giant cells in response to CpG-ODN. *Vortrag auf dem Spring Meeting der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Innsbruck, 2002*

Bock, C., von Stebut, E., Sarris, A., Rothenfusser, S., Kerkmann, M., Endres, S., und Hartmann, G., Human monocytes primed with GM-CSF and IFN- γ and stimulated with CpG-ODN form multinucleated giant cells which control intracellular replication of *Leishmania major*. *Poster für das FASEB/AAI-Meeting in New Orleans, USA, 2002*

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Endres für die Möglichkeit, in der engagierten und herzlichen Atmosphäre der Klinischen Pharmakologie arbeiten zu können, für seine fachliche und persönliche Unterstützung und für die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf internationalen Kongressen präsentieren zu können.

Ich danke Herrn PD Dr. Gunther Hartmann für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, die methodische Anleitung und besonders für die stete Motivation.

Ich danke Frau Dr. Anne Krug für die Begleitung meiner ersten Schritte ins wissenschaftliche Arbeiten.

Ich danke meinen Laborkollegen, vor allem Dr. Simon Rothenfusser, Dr. Katharina Tschoep und Miren Kerkmann, die mir mit freundschaftlichem Rat und Inspiration stets zur Seite standen.

Frau Dr. von Stebut danke ich für die Betreuung der Leishmanien-Experimente und für die herzliche Aufnahme in Mainz.

Ich danke meinen Mitarbeiterinnen in der Apotheke, vor allem Caroline Frank, Christiane Fröhlich und Dagmar Schwarz, die mir durch ihr Engagement die Erstellung der Dissertation erst ermöglicht haben.

Ich danke meinen Freunden Bettina Brunner und Hans-Peter Pösl für ihre unschätzbare Hilfe.

Ich danke meinen Schwestern und ganz besonders meinen Eltern.

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Carmen Bock
Geburtsdatum: 05. Dezember 1973 in Vohenstrauß

Schulbildung:

1980 – 1984 Trautwein-Grundschule Moosbach
1984 – 1993 Ortenburg-Gymnasium Oberviechtach
05/1993 Abitur

Hochschulausbildung:

1993 – 04/ 98 Pharmaziestudium an der Universität Regensburg
07/1999 Approbation als Apothekerin
09/1999 – 05/2003 Dissertation in der Abteilung für Klinische Pharmakologie
der LMU München, Professor Endres

Praktika:

08/1994 Praktikum in der Medizinstation von Rodriguez/Formiga,
Minas Gerais, Brasilien
10/1994 Famulatur in der Apotheke am Schlesischen Tor in Berlin
08-09/1996 Apotheke des Klinikums in Regina, Kanada
05 –11/1998 Erster Teil des Praktischen Jahres in der Apotheke des
Städtischen Krankenhauses München-Harlaching
11/1998 – 04/1999 Zweiter Teil des Praktischen Jahres in der
Apotheke im Vesten Haus in Weiden

Beruflicher Werdegang:

ab 02/2000 Leiterin der Paracelsus-Apotheke in Weiden