

**Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
der Technischen Universität München**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c. H. Wagner, Ph.D.(Melbourne) )

Kostimulation und Suppression muriner T-Lymphozyten durch  
guaninreiche Phosphorothioatoligonukleotide

Ulrich Salzer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. K. Heeg, Philipps-Universität Marburg  
2. Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne)

Die Dissertation wurde am 04.03.2002 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.07.2002  
angenommen.



meinen Eltern gewidmet



**Abkürzungen**

Ak	Antikörper
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CpG-ODN	CpG-Oligodesoxyribonukleotid
cpm	counts per minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cellsorter
FKS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-12	Interleukin 12
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
MBq	Mega Bequerel
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex

## Abkürzungen

---

MLR	mixed lymphocyte reaction
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
Ova	Ovalbumin
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PJ	Propidiumjodid
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RT	Raumtemperatur
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T - Zell - Rezeptor
ZTL	Zytotoxischer T - Lymphozyt

## Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung .....	13
I.1. Das Immunsystem .....	13
I.2. Erkennung von Antigen und Aktivierung von T-Lymphozyten .....	15
I.3. Pathogenassoziierte „Gefahrensignale“ und ihre Bedeutung .... für das 2-Signalmodell der T-Zellaktivierung	17
I.4. Synthetische Oligonukleotide und ihre Anwendung in der .....	20
Immunologie	
I.4.1. Immunstimulatorische Eigenschaften bakterieller .....	20
DNA und von CpG Oligonukleotiden	
I.4.2. Guaninreiche Oligonukleotide .....	23
II. Eigene Fragestellung .....	27
III. Material und Methoden .....	29
III.1. Mäuse .....	29
III.2. Zelllinien .....	29
III.3. Medien und Lösungen .....	30
III.3.1. Zellkulturmedium	
III.3.2. Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	
III.3.3. Paraformaldehyd-Fixierlösung	
III.3.4. Eosin Lösung	
III.3.5. Fötale Kälberserum (FKS)	
III.3.6. Ficoll 1,077	

III.4. Mitogene Substanzen und Wachstumsfaktoren .....	31
III.4.1. Interleukin-2 (IL-2)	
III.4.2. Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)	
III.4.3. Concanavalin A (Con A)	
III.4.4. Lipopolysaccharid (LPS)	
III.4.5. Ovalbumin	
III.4.6. Ionomycin	
III.4.7. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	
II.5. Antikörper .....	32
III.5.1. Rabbit anti syrian Hamster IgG	
III.5.2. Biotin markierte Antikörper	
III.5.3. Fitc markierte Antikörper	
III.5.4. Phycoerythrin (PE) markierte Antikörper	
III.5.5. Unmarkierte Antikörper	
III.5.6. Sonstige Antikörper	
III.6. Zusätzliche Reagenzien für die Durchflusszytometrie .....	34
III.6.1. Propidiumjodid	
III.6.2. Fluo-3 acetoxymethylester	
III.7. Polyanionische Substanzen Heparin, Dextransulfat und Fucoidan	34
III.8. Oligodesoxyribonukleotide (ODN) .....	34
III.9. Zellgewinnung und Kulturbedingungen .....	35
III.9.1. Gewinnung von Lymphknotenzellen	
III.9.2. Gewinnung von Milzzellen	
III.9.3. Herstellung von Concanavalin A aktivierten T-Zellblasten	
III.9.4. Isolierung von T-Lymphozyten und CD4 <sup>+</sup> oder CD8 <sup>+</sup> Sub- populationen mittels magnetischer Separierung	
III.9.5. Koppelung von Antikörpern an Zellkulturplatten	



III.9.6. Kulturbedingungen	
III.10. Elisa zum Nachweis von murinem Interleukin 2 .....	37
III.11. Fluoreszenzfärbungen und Durchflusszytometrie .....	38
III.11.1. Durchflusszytometrie	
III.11.2. Direkte Immunfluoreszenzfärbung	
III.11.3. Messung von intrazellulären Ca <sup>2+</sup> Spiegeln mit Fluo-3 AM	
III.12. Zellzyklusanalyse .....	38
III.13. Immunisierung mit Ovalbumin und <sup>51</sup> Cr-Zytotoxizitätstest .....	39
III.13.1. Immunisierung von Mäusen mit Ovalbumin	
III.13.2. <sup>51</sup> Cr-Zytotoxizitätstest	
III.14. Proliferationsassay .....	40
IV. Eigene Ergebnisse .....	41
IV.1. Einfluss guaninreicher ODN auf murine T-Lymphozyten unter den restriktiven Bedingungen einer reinen TZR Stimulation	41
IV.1.1.a. Proliferation	
IV.1.1.b. CD25 Expression	
IV.1.1.c. IL-2 Produktion	
IV.1.1.d. Sequenzvoraussetzungen	
IV.1.2. IL-2 Abhängigkeit .....	46
IV.1.3. Cyclosporin A Empfindlichkeit .....	47
IV.1.4. Wirkung guaninreicher ODN auf CD28 -/- Lymphozyten	48
IV.1.5. Kompetetion mit Polyanionen .....	49
IV.2. Einfluss guaninreicher ODN auf die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen unter optimalen Stimulationsbedingungen	51

IV.2.1. Primär stimulierte T-Zellen .....	51
IV.2.1.a. Mixed lymphocyte reaction	
IV.2.1.b. Stimulation mit mAk gegen CD3 und CD28	
IV.2.1.c. Stimulation mit mAk gegen CD3 und PMA	
IV.2.2. Concanavalin A aktivierte T-Zellblasten .....	55
IV.2.3. Wirkung guaninreicher ODN auf die autonome Pro- ...	58
liferation von humanen und murinen Zelllinien	
IV.2.4. Untersuchungen zur Wirkungsweise von GR1 .....	60
IV.2.4.a. aktivierungsabhängige Oberflächenmarker	
unter dem Einfluss von GR1	
IV.2.4.b. Wirkung von GR1 auf T-Zellen der CD28 -/- Maus	
IV.2.4.c. Einfluss von GR1 auf den Ca <sup>2+</sup> Einstrom nach TZR	
Stimulation	
IV.2.4.d. Nachweis einer möglichen Apoptoseinduktion	
durch guaninreiche ODN	
IV.3. Wirkungen von GR1 auf T-Zellantworten in vivo .....	70
IV.3.1. MLR mit Zellen von GR1 behandelten Mäuse .....	70
IV.3.2. Einfluss von GR1 auf die in vivo Stimulation mit SEB .....	71
IV.3.3. Einfluss von GR1 auf CD8 <sup>+</sup> T-Zellen Ova immunisierter Mäuse	72
V. Diskussion .....	75
V.1. Guaninreiche Oligonukleotide kostimulieren murine T-Zellen ....	75
V.1.1. Ein TZR Stimulus konditioniert für die Wirkung der Oligo- nukleotide	75
V.1.2. Die ODN vermittelte Kostimulation muriner T-Zellen .....	76
ist ein CpG-unabhängiger Effekt	
V.1.3. ODN vermittelte T-Zellkostimulation – Ein Effekt von .....	77
Quadruplex-DNA?	

V.1.4. Guaninreiche Oligonukleotide – Ersatz von oder Konkurrenz mit CD28?	78
V.1.5. Üben Guaninreiche ODN ihre Wirkung durch Bindung an die Zellmembran oder Oberflächenrezeptoren aus?	79
V.2. Inhibition von T-Zellaktivierung und –wachstum durch guaninreiche ODN	80
V.2.1. Die wachstumshemmende Potenz guaninreicher ODN variiert abhängig von der Stimulationsart der T-Zellen	81
V.2.2. Die antiproliferative Wirkung von GR1 ist unabhängig von der CD28 Expression	82
V.2.3. Erklärungsansätze für die antiproliferative Wirkung ..... guaninreicher ODN	83
V.3. In vivo Aktivität guaninreicher Oligonukleotide .....	85
VI. Zusammenfassung .....	87
VII. Literaturverzeichnis .....	89
VIII. Danksagung .....	101

---

## I. Einleitung

### I.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem der Säugetiere wird gebildet durch eine heterogene Gruppe von zellulären und nichtzellulären Komponenten, deren gemeinsame Aufgabe es ist, den eigenen Organismus vor infektiösen Mikroben zu schützen. Aus medizinischer Sicht kann diese Definition noch erweitert werden: das Immunsystem hat bei vielen menschlichen Leiden eine herausragende Bedeutung, die weit über das Feld der Infektionskrankheiten hinausgeht, wie beispielsweise bei der Abwehr von Tumoren. Auch wirkt das Immunsystem oft selbst krankmachend, was sich als Allergie oder Autoimmunerkrankung äussern kann.

Die Immunologie unterscheidet zwischen angeborener und erworbener Immunität.

Polymorphkernige neutrophile Zellen, Makrophagen und natürliche Killerzellen sind wichtige Vertreter der „angeborenen Immunität“. Diese bildet die erste Verteidigungslinie gegen eine Vielzahl von Erregern. Ihre Reaktion ist schnell, aber unangepasst und läuft auch bei wiederholtem Kontakt mit dem gleichen Erreger immer gleich ab.

T- und B-Lymphozyten sind die zelluläre Grundlage der „erworbenen Immunität“.

Sie dient dazu, Eindringlinge zielgerichtet aufzuspüren und zu zerstören. Beim Erstkontakt mit einem Erreger ist zwar eine gewisse Anlaufphase nötig, dann jedoch ist diese Abwehr durch den Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses höchst effektiv und spezifisch.

Um ihre Aufgaben zu erfüllen, müssen beide Systeme in der Lage sein, körperfremde von körpereigenen Substanzen zu unterscheiden. Körperfremde, aber auch körpereigene Substanzen, welche durch das Immunsystem erkannt werden, bezeichnet man als Antigene, letztere genauer auch als „Autoantigene“. Antigene sind zum grössten Teil Proteine oder deren

Bestandteile, aber auch Polysaccharide und Nukleinsäuren besitzen antigene Eigenschaften. Faktisch wären damit auch alle körpereigenen Strukturen „Antigene“, da diese ja aus den gleichen Grundbausteinen bestehen. Wie also unterscheiden angeborenes und erworbenes Immunsystem zwischen „körperfremd“ und „körpereigen“?

Das erworbene Immunsystem lernt in der Tat die Unterscheidung zwischen „körpereigen“ und „körperfremd“. Die zellulären Hauptbestandteile der erworbenen Immunität, die T- und B- Lymphozyten, sind während ihrer frühen Entwicklung in speziellen Organen ( der Thymus für die T-Zellen, das Knochenmark (engl. **B**one marrow) für die B-Zellen) den verschiedensten körpereigenen Antigenen ausgesetzt.

Das angeborene Immunsystem bedient sich einer anderen Strategie bei der Unterscheidung zwischen „körperfremd“ und „körpereigen“. Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen spezifisch bestimmte Muster auf infektiösen Mikroorganismen und nehmen diese als „Gefahrensignale“ wahr (Matzinger, 1994). Die hierfür verantwortlichen Rezeptoren gehören zur Toll-Familie und können beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS), bakterielle DNA oder virale dsRNA erkennen. Ein Vorteil der Erkennung dieser sogenannten PAMP (engl. **p**athogen **a**ssociated **m**olecular **p**atterns) liegt darin, dass diese im Säugetier nicht gebildet werden können. Des Weiteren macht diese Mustererkennung es möglich, dass durch wenige spezifische Rezeptoren das Eindringen einer Vielzahl unterschiedlicher Erreger schnell erfasst werden kann. Und schliesslich kommt diesen PAMP eine besondere Rolle bei der Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen und der Induktion der adaptiven Immunantwort zu.

Die spezifische Erkennung von Antigenen durch Zellen des erworbenen Immunsystems und deren Beeinflussung durch „Gefahrensignale“ wird in den folgenden Abschnitten beschrieben.

## I.2. Erkennung von Antigenen und Aktivierung von T - Lymphozyten

T-Lymphozyten sind nicht in der Lage, beispielsweise ein Bakterium als ganzes zu erkennen. Die Information, welche ein Bakterium als infektiöse Mikrobe kennzeichnet, muss also erst in eine für die T-Zelle wahrnehmbare Form übersetzt werden. Dies ist Aufgabe der professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ), zu denen Makrophagen, dendritische Zellen und die Langerhans-Zellen der Haut gehören. Durch die APZ werden Bakterien oder deren Bestandteile aufgenommen. Auch die oben erwähnten PAMP werden dabei freigesetzt und durch die APZ erkannt. Dies führt unter anderem zur Aktivierung und Maturierung von dendritischen Zellen, wodurch der Prozess der Antigenpräsentation an T-Lymphozyten noch erheblich verbessert wird (Hartmann et al., 1999; Jakob et al., 1998). Die Proteine eines Erregers werden von der APZ in endosomalen und lysosomalen Zellkompartimenten aufgeschlossen. Die daraus entstandenen Bruchstücke von nur wenigen Aminosäuren Länge werden im Austausch gegen die sogenannte invariante Kette an MHC (engl. **m**ajor **h**istocompatibility **c**omplex) Moleküle gebunden und so an der Zelloberfläche der APZ exprimiert. MHC Moleküle sind sozusagen der Präsentierteller der APZ, auf der das Antigen in einer nun für den T-Lymphozyten erkennbaren Form dargeboten wird. Die T-Zelle erkennt den Antigen-MHC Komplex auf der APZ mit ihrem T-Zellrezeptor (TZR). Das Schicksal einer T-Zelle während ihrer Entwicklung ist abhängig von der Spezifität ihres TZR. In den Vorläuferzellen der T-Lymphozyten entsteht durch einen als somatische Rekombination bezeichneten Prozess eine ausserordentlich große Vielfalt von TZR, die jeweils von unterschiedlicher Spezifität sind (Davis und Bjorkman, 1988). Dabei exprimiert jede einzelne T-Zelle wiederum nur einen TZR der gleichen Spezifität. Unter diesen ca.  $10^{12}$  unterschiedlichen TZR und damit auch ca.  $10^{12}$  unterschiedlichen T-Lymphozyten findet eine Selektion im Thymus statt. Dabei muss der TZR einer T-Zelle folgende Kriterien erfüllen: 1. Er muss ein MHC Molekül erkennen und binden können; 2. Er darf auf körpereigene „Antigene“, welche ihm im

Thymus auch „präsentiert“ werden, nicht reagieren (Zinkernagel und Doherty, 1974).

Es werden also die T-Zellen positiv selektioniert (von Boehmer, 1994), welche MHC Moleküle erkennen können und die T-Zellen negativ selektioniert, welche auf körpereigene Strukturen ansprechen (Sprent, 1995a). Dieser Prozess der Negativselektion wird auch als „klonale Deletion“ bezeichnet (Sprent und Webb, 1995b).

Eine reife T-Zelle hat diese Phase der Auslese überstanden und ist fähig mit ihrem TZR das von der APZ verarbeitete Antigen im Kontext eines MHC Moleküls wahrzunehmen.

Die MHC Moleküle können weiter in 2 Hauptgruppen unterteilt werden, die MHC Klasse I, welche sich auf allen kernhaltigen Körperzellen, und die MHC Klasse II, welche sich ausschliesslich auf den oben genannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen befindet. Die beiden unterschiedlichen MHC Klassen sprechen wiederum zwei verschiedene Subpopulationen von T-Zellen an. Professionell antigenpräsentierende Zellen präsentieren ihr an ein MHC Klasse II Molekül gebundenes Antigen den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, das MHC Klasse I Molekül einer beispielsweise mit einem Virus infizierten Leberzelle reagiert nur mit einer CD8<sup>+</sup> T-Zelle. CD4 und CD8 Moleküle sind Korezeptoren, welche zusammen mit dem TZR auf den T-Lymphozyten exprimiert werden. CD4 positive T – Zellen stimulieren B – Zellen zur Proliferation und Differenzierung und aktivieren Makrophagen, welche daraufhin phagozytierte Erreger zerstören können. CD8 positive T-Zellen töten Zellen ab, welche mit einem intrazellulären Erreger infiziert sind.

Abb.1.1. zeigt schematisch die Prozessierung eines Antigens durch eine APZ und dessen Präsentation an eine CD4<sup>+</sup> T-Zelle.



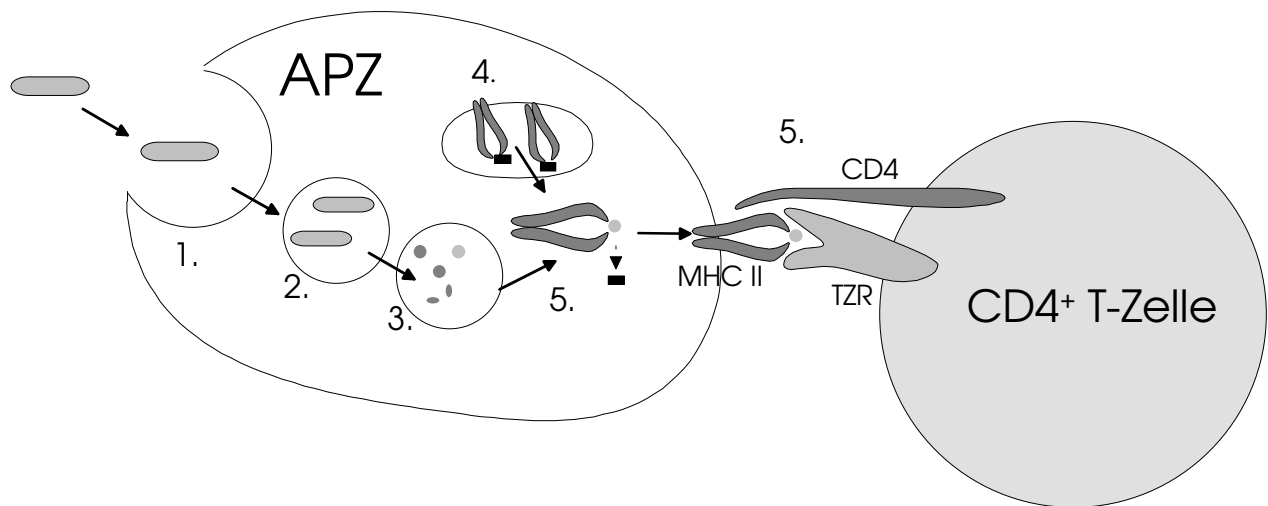


Abb.1.1. Prozessierung von Antigenen und Antigenpräsentation. 1. Endozytische Aufnahme eines pathogenen Erregers (z.B. Bakterium) durch APZ., 2. und 3. Proteolytische Degradation von internalisierten Proteinen in endo- und lysosomalen Vesikeln. 4. Bildung von MHC II Molekülen im endoplasmatischen Retikulum, Transport zu den Vesikeln. 5. Bindung von Peptid an MHC Klasse II Molekül, Wegfall der invarianten Kette (■), und Transport des Antigen-MHC Komplexes an die Zelloberfläche. 5. MHC-Antigen Komplex wird durch einen CD4+ T-Lymphozyten erkannt.

Die Interaktion von TZR und MHC-Antigen Komplex führt über weitere, mit dem TZR assoziierte Oberflächenproteine (wie z.B. die CD3 $\zeta$  Ketten) zur Aktivierung einer komplexen Signalkaskade. Das TZR Signal allein reicht allerdings nicht zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle aus. Im Gegenteil, das TZR-Signal allein kann sogar zum Tod der Zelle oder in den Zustand der Anergie führen (Schwartz, 1997). Ein weiteres, zweites Signal wird für die Initiation einer effektiven T-Zell-abhängigen Immunantwort notwendig (Mueller et al., 1989). Es wird auch durch professionelle APZ an die T-Zelle vermittelt, und ist das Ergebnis der Interpretation eines „Gefahrensignals“.

### 1.3. Pathogenassoziierte „Gefahrensignale“ und ihre Bedeutung für das 2 - Signalmodell der T-Zellaktivierung

Wie anfänglich bereits erwähnt, besitzen Zellen des angeborenen Immunsystems die Fähigkeit, durch besondere Erkennungssysteme bestimmte, vielen pathogenen Erregern gemeinsame, charakteristische Muster zu erfassen. Ein solches Muster ist das Lipopolysaccharid oder Endotoxin, ein Bestandteil der äusseren Zellmembran vieler gramnegativer Bakterien. Wird LPS im Rahmen einer bakteriellen Infektion freigesetzt, so bindet es im Blut

zunächst an das Lipoproteinbindungsprotein (LPB). Der LPB-LPS Komplex assoziiert dann mit dem Oberflächenmolekül CD14 auf den Makrophagen, was wiederum über einen assoziierten Rezeptor der Toll Familie zu einer Signalgebung im Makrophagen führt (Brightbill und Modlin, 2000). Durch diese wird beim Makrophagen das Ausmass der Antigenpräsentation gesteigert, er sezerniert Mediatoren und kostimulatorische Moleküle werden auf seiner Zelloberfläche hochreguliert. Diese freigesetzten Mediatoren, unter anderem Interleukin 12,  $TNF\alpha$  und andere proinflammatorische Zytokine, beeinflussen die Gesamtheit der an der Immunreaktion gegen das Pathogen beteiligten Zellen. Für die T-Lymphozyten sind die gesteigerte Expression von MHC Molekülen und kostimulatorischen Rezeptoren, wie B7.1 und B7.2 von entscheidender Bedeutung (June et al., 1994).

Diese beiden Moleküle übermitteln das zweite, für die vollständige Aktivierung von T-Zellen notwendige Signal. Dieses wird von den T-Lymphozyten über das Oberflächenmolekül CD28 empfangen (Gross et al., 1992; Turka et al., 1990). Neben LPS gibt es noch weitere pathogenassoziierte, aber auch endogene Gefahrensignale, und auch ist CD28 nicht der einzige kostimulatorische Rezeptor auf den T-Lymphozyten (Watts und DeBenedette, 1999).

Die APZ spricht die T-Zelle also auf 2 Wegen an: Das prozessierte (Protein-)Antigen eines Pathogens wird als Signal 1 über den TZR gegeben. Ein mit dem Pathogen assoziiertes Gefahrensignal gibt das Signal 2 über einen kostimulatorischen Rezeptor wie CD28. Durch die Stimulation von CD28 wird unter anderem die Sezernierung des autokrinen Wachstumsfaktors IL-2 und die vermehrte Bildung von antiapoptotischen Proteinen der Bcl Familie gefördert (Mueller et al., 1996). Dadurch kann dann erst eine effektive T-Zellantwort eingeleitet werden (Mueller et al., 1996; Vella et al., 1997).

Das 2-Signal Modell der T-Zellaktivierung ist in Abb.1.2. wiedergegeben.

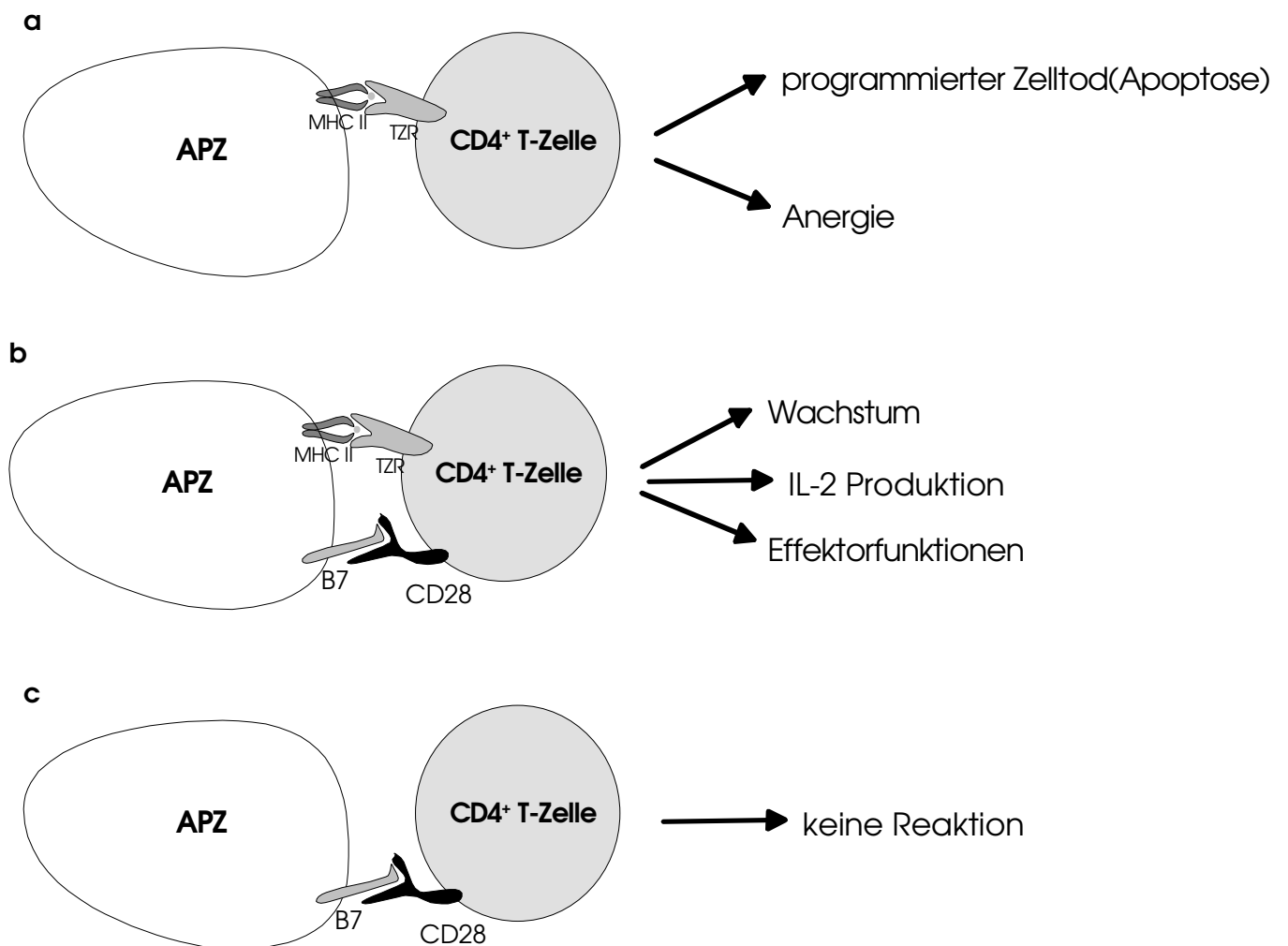


Abb.1.2.a-c. Die 2 - Signaltheorie der T-Zellaktivierung. a. Die T-Zelle erhält nur ein Signal über den TZR (Signal 1), b. Die T-Zelle erhält Signal 1 und ein kostimulatorisches Signal über CD28 (Signal 2), c. Die T-Zelle erhält nur Signal 2 (Dies kommt natürlicherweise nicht vor, kann aber in der Zellkultur simuliert werden).

Auf den Prozess der T-Zellaktivierung Einfluss zu nehmen, ist in der Medizin bei verschiedenen Krankheitsbildern von großem Nutzen. Die Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK 506 hemmen den Ca<sup>2+</sup> abhängigen Anteil des TZR Signals und unterdrücken so eine Transplantatabstoßung. Monoklonale Antikörper gegen das TZR assoziierte CD3 Molekül blockieren die Interaktion des TZR mit MHC-Antigen Komplex und verhindern so die Aktivierung der T-Zelle.

Doch neben verschiedenen Pharmaka und Antikörpern verspricht eine weitere Gruppe therapeutischer Substanzen, eine Vielzahl neuartiger Ansätze zur Modulation der Immunantwort zu bieten. Diese neue Stoffgruppe bilden

synthetische Oligonukleotide (ODN), also künstlich hergestellte einzelsträngige DNA Stücke von ca. 15 bis 30 Basenpaaren Länge.

### 1.4. Synthetische Oligonukleotide und ihre Anwendung in der Immunologie

Die Anwendungsbereiche für synthetische ODN sind vielfältig. Sogenannte „antisense“ Ansätze verfolgen das Ziel, die Transkription bestimmter Proteine durch spezifische Hybridierung eines ODN mit der messenger-RNA dieses Proteins zu verhindern (Stein und Cheng, 1993; Stein und Narayanan, 1994). „Triple helix“ bildende ODN sollen spezifisch an eine Zielsequenz in der doppelsträngigen DNA binden und so die Transkription einer für ein bestimmtes Protein kodierende messenger RNA verhindern (Sun und Helene, 1993).

Neben diesen sehr sequenzspezifischen, auf der Komplementarität des ODN zur entsprechenden Zielsequenz beruhenden Ansätzen zeigten sich auch eine Reihe interessanter, sequenzunabhängiger Effekte. Von herausragender Bedeutung für die Immunologie ist hierbei die Entdeckung der immunstimulatorischen Eigenschaften von bakterieller DNA und CpG Oligonukleotiden.

#### 1.4.1. Immunstimulatorische Eigenschaften bakterieller DNA und von CpG Oligonukleotiden

Sieht man vom Phänomen der Anti – DNA Antikörper, welche bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen auftreten, ab, galt DNA lange Zeit als immunologisch inert.

Mitte der achtziger Jahre machte eine japanische Arbeitsgruppe die Entdeckung, dass für die Antitumoraktivität einer BCG (**B**acillus **C**almette **G**uerin) Formulierung (diese enthielt Bestandteile abgetöteter Bakterien eines Mycobacterium bovis Stammes) die DNA Fraktion den wirksamen Bestandteil darstellte (Tokunaga et al., 1984).

Die als My-1 bezeichnete DNA Fraktion führte zur Aktivierung von natürlichen Killerzellen und zur Produktion von Interferon  $\alpha/\beta$  und  $\gamma$  (Yamamoto et al., 1988). Es stellte sich alsbald heraus, dass die DNA nicht als Makromolekül vorliegen musste, sondern dass vielmehr auch kurze, einzelsträngige DNA - Oligomere imstande waren, die gleichen Effekte hervorzurufen (Kataoka et al., 1992; Tokunaga et al., 1992). Die weiteren Untersuchungen identifizierten bestimmte in Palindromen angeordnete Sequenzmotive als herausragendes gemeinsames Merkmal in den Oligomeren mit biologischer Aktivität (Kuramoto et al., 1992; Tokunaga et al., 1992; Yamamoto et al., 1992).

Die Arbeitsgruppe um Arthur Krieg berichtete 1995 über die Aktivierung von B - Lymphozyten durch bakterielle DNA (Krieg et al., 1995). Säugetier DNA zeigte keine derartigen Effekte. Auch diese Ergebnisse liessen sich mit DNA - Oligonukleotiden, in welchen ein bestimmtes Sequenzmotiv enthalten war, reproduzieren (Ballas et al., 1996).

Die immunstimulatorischen Eigenschaften wurden nun in Verbindung gebracht mit dem Vorhandensein sogenannter CpG Motive in den verwendeten Oligonukleotiden (Klinman et al., 1996; Krieg, 1996). Die von Tokunaga beschriebenen Palindrome erweiterte Krieg zu einem Sequenzmotiv, welches ein zentrales CpG Dinukleotid, flankiert von 2 Purinbasen am 5' Ende und 2 Pyrimidinbasen am 3' Ende beinhaltete (Sonehara et al., 1996). CpG Dinukleotide finden sich in bakterieller DNA in der erwarteten zufälligen Häufigkeit von etwa 1:16, während sie in eukaryoter DNA nur mit einer Frequenz von 1:60 auftauchen (Antequera und Bird, 1993; Karlin et al., 1994). Dieses Phänomen wird als CpG - Suppression bezeichnet. Eine weitere Auffälligkeit besteht im unterschiedlichen Methylierungsgrad dieser Dinukleotide im pro- bzw. eukaryoten Genom (Bird, 1993; Cross und Bird, 1995) . Mit der Inversion des CpG zu GpC oder der Methylierung des Cytosinrests gehen die immunstimulatorischen Eigenschaften der ODN verloren, so dass man davon ausgehen kann, dass die strukturellen Unterschiede zwischen bakterieller und Säugetier DNA für eben diese ursächlich sind.

Damit wäre im Genom der Bakterien neben der rein genetischen Information noch eine weitere enthalten, nämlich die eines „Gefahrensignals“ für das

Immunsystem (Pisetsky, 1996; Pisetsky, 1997). Makrophagen und dendritische Zellen werden direkt durch CpG-ODN aktiviert, nach einer sequenzunabhängigen Aufnahme der ODN in die Zellen kommt es dabei zur Aktivierung des Stress-Kinasen Signalwegs (Häcker et al., 1998). Als Rezeptor für CpG-ODN wurde erst kürzlich ein Protein aus der Toll Familie identifiziert (Hemmi et al., 2000).

Angeregt durch CpG-ODN sezernieren Makrophagen IL-12, sowie andere proinflammatorische Zytokine, es kommt ähnlich wie durch LPS zu einer gesteigerten Antigenpräsentation und der vermehrten Expression von kostimulatorischen Molekülen wie B7.1 und B7.2 (Sparwasser et al., 1997) .

Zusammen mit Proteinantigenen werden so durch CpG ODN antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T – Lymphozyten induziert (Lipford et al., 1997).

Im lebenden Organismus führen diese verschiedenen Wirkungen zu einer Differenzierung der CD4<sup>+</sup> oder T-Helferzellen in die Th1 Richtung. Eine Th1 betonte Immunantwort ist vor allem wirksam gegen intrazelluläre Erreger. Hingegen ist die Aufgabe einer Th2 gewichteten Immunität die Abwehr von Parasiten. Die wesentlichen Charakteristika dieser beiden Typen von Immunreaktionen sind in Tabelle T1 aufgeführt.

	<i>Th1 Subpopulation</i>	<i>Th2 Subpopulation</i>
<b>Stimulus zur Differenzierung</b>	Interleukin 12	Interleukin 4
<b>Sezernierte Zytokine</b>	IFN $\gamma$ , IL-2, TNF	IL-4, IL-5, IL-13
<b>Antikörperisotypen</b>	IgG <sub>2a</sub>	IgE, IgG <sub>1</sub>
<b>Makrophagenaktivierung</b>	+++	-

Tabelle T1: Wichtige Marker von Th1 und Th2 Immunantworten

Für die CpG - Oligonukleotide ergeben sich aufgrund ihrer Eigenschaften Einsatzmöglichkeiten als Adjuvantien für Impfstoffe, zur Korrektur fehlgeleiteter Immunreaktionen bei der Allergie oder auch in der Tumorthherapie (Carpentier et al., 2000; Kline, 2000; McCluskie et al., 2000). Die verschiedenen Effekte von CpG DNA sind in Abb. 1.3. zusammengefasst.

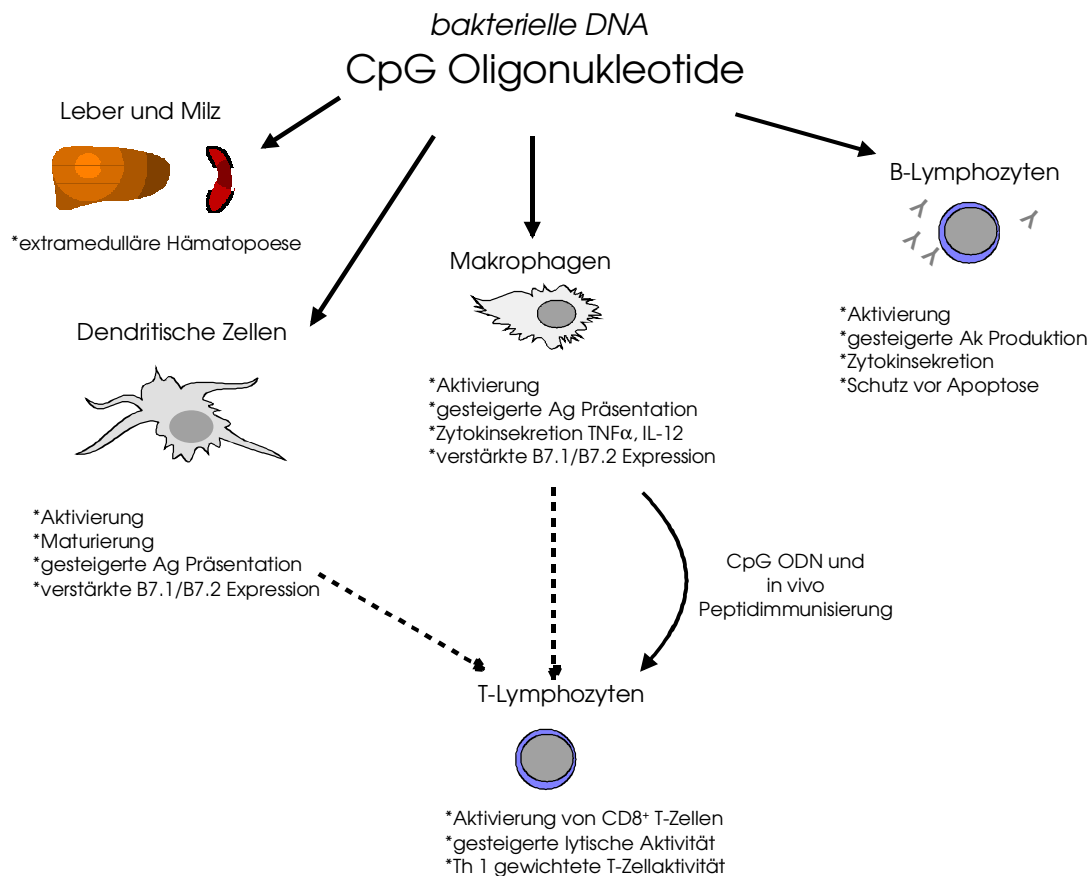


Abb.1.3. Synopsis der Effekte von CpG DNA. Dargestellt sind die jeweiligen Zielzellen bzw. Zielorgane und die entsprechenden Wirkungen.

#### 1.4.2. Guaninreiche Oligonukleotide

Neben den erstaunlichen Wirkungen der CpG-ODN auf die Zellen des angeborenen Immunsystems, gibt es eine Gruppe weiterer ODN, die eine Reihe ungewöhnlicher biologischer Effekte zeigt, welche sich nicht durch eine Wirkung als „antisense“ oder „triple helix“ bildende ODN erklären lassen.

Diese Gruppe von ODN ist gekennzeichnet durch den relativ hohen Gehalt an Guaninbasen. Diese Guaninbasen sind dann oft blockweise zu je 3 bis 4 Basen in der ODN-Sequenz angeordnet. Die Guaninblöcke verleihen diesen ODN besondere Eigenschaften. Sie sind imstande, mit sich selbst zu hybridisieren und dadurch komplexe Strukturen zu bilden, wie sie in Abb.1.3. dargestellt sind (Sen und Gilbert, 1990).

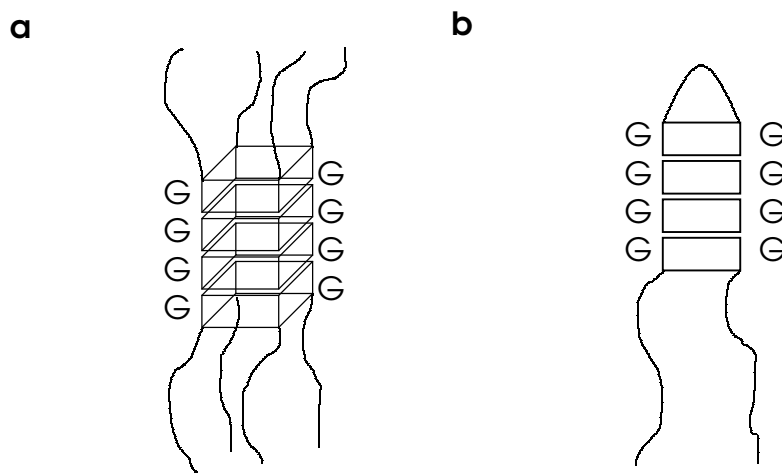


Abb.1.4. Strukturen höherer Ordnung gebildet durch guaninreiche ODN. a. Darstellung sogenannter Quadruplex DNA, wie sie durch die Hybridisierung von 4 einzelnen Oligonukleotiden gebildet wird, die je einen Block von 4 Guaninbasen enthalten. b. Schleifenförmige Rückfaltung eines guaninreichen ODN mit zwei solchen Guanintetraden. Die Guaninreste sind bei dieser atypischen Form der Basenpaarung nicht nach dem Watson-Crick Prinzip, sondern über sogenannte Hoogsteen Bindungen miteinander verknüpft.

Neben dieser strukturellen Besonderheit, durch welche guaninreiche ODN vermehrt an bestimmte Proteine binden können (Benimetskaya et al., 1997; Pearson et al., 1993), wird auch über antivirale und antiproliferative Effekte guaninreicher ODN berichtet (Suzuki et al., 1999; Yaswen et al., 1993).

Guaninreiche Sequenzen finden sich in eukaryoter DNA beispielsweise im Bereich der Zentromeren oder Telomeren der Chromosomen. Auch sind die Bindungsmotive für einige Transkriptionsfaktoren wie die der EGR Familie oder SP1 guaninreich.

Die Einführung von Polyguaninelementen in CpG Oligonukleotide hat unterschiedliche Auswirkungen.

Derartige phosphorothioatmodifizierte Hybrid-ODN sind nicht mehr in der Lage, CpG typische Wirkungen auszuüben, wie z.B. die Induktion von Makrophagen zur Zytokinsekretion (Heeg, 2000; Lee et al., 2000).

Im Gegensatz dazu führen die zusätzlichen Guaninelemente bei NK-Zellen zu einer Verbesserung der CpG Wirksamkeit (Kuramoto et al., 1992).

Auch T-Lymphozyten sprechen auf derartige Hybrid-ODN vermehrt an. In vitro T-Zellmodellen zeigte sich eine gesteigerte kostimulatorische Aktivität der-



artiger ODN in Abhängigkeit eines TZR Stimulus (Bendigs et al., 1999). Reine CpG ODN waren in diesen Modellen weit weniger effektiv und es wurde im weiteren Verlauf angenommen, dass deren „kostimulatorische“ Aktivität nur indirekt über ihre Effekte auf Makrophagen vermittelt worden ist (Lipford et. al., 2000).

Während also Polyguaninsequenzen im Gegensatz zu CpG-ODN auf Zellen des angeborenen Immunsystems keine oder sogar eine negative Wirkung hatten, eigneten sie sich bestens zur Aktivierung von NK Zellen und Kostimulation von T-Lymphozyten.



## II. Eigene Fragestellung

In dieser Arbeit soll die Wirkung guaninreicher Oligonukleotide auf die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktionen von murinen T Lymphozyten untersucht werden. Folgende Fragen sollen in diesem Zusammenhang geklärt werden:

1. Wie wirken guaninreiche ODN auf murine T-Zellen in einem definierten, für kostimulatorische Agenzien hochempfindlichen in vitro Modell?
2. Unter welchen Bedingungen lässt sich eine kostimulatorische Aktivität registrieren und wie lässt sie sich genauer charakterisieren?
3. Welche Effekte sind in in vitro T-Zellstimulationsassays mit optimalen Stimulationsbedingungen zu beobachten?
4. Welche phänotypischen Veränderungen bewirken guaninreiche ODN bei murinen T-Lymphozyten und wie ist ihr Wirkmechanismus?
5. Lassen sich durch guaninreiche ODN Immunreaktionen im lebenden Organismus beeinflussen?



### III. Material und Methoden

#### III.1. Mäuse

Es wurden weibliche Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen verwendet, die im institutseigenen Tierstall unter pathogenfreien Bedingungen gehalten wurden.

<i>Mausstamm</i>	<i>MHC-Haplotyp</i>	<i>Herkunft</i>
<b>Balb/c</b>	H-2K <sup>d</sup>	Harlan, Borchon
<b>C57/BL6</b>	H-2K <sup>b</sup>	Harlan, Borchon
<b>CD28 -/-</b>	H-2K <sup>b</sup>	Prof.Dr. K.Pfeffer, München

Tabelle T2: Übersicht der verwendeten Mausstämmen unter Angabe deren MHC-Haplotyps und ihrer Herkunft.

#### III.2. Zelllinien

Die in nachfolgender Tabelle T3 beschriebenen Zelllinien wurden verwendet.

<i>Zelllinie</i>	<i>% FKS Medium</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Herkunft</i>
<b>EL4</b>	5% Click´s RPMI	murines T-Zell Lymphom	ATCC, Rockville, USA
<b>Raji</b>	5% RPMI 1640	humanes B-Zell Lymphom	ATCC, Rockville, USA
<b>Jurkat</b>	5% RPMI 1640	humane T-Zell Leukämie	ATCC, Rockville, USA
<b>J774</b>	5% Click´s RPMI	murine Makrophagenlinie	ATCC, Rockville, USA
<b>U937</b>	5% RPMI 1640	Humanes mono- zytäres Lymphom	ATCC, Rockville, USA
<b>EG-7</b>	5% Click´s RPMI	Ova transfizierte EL-4 Zellen	Dr. Rammensee, Tübingen
<b>A20</b>	5% Click´s RPMI	Murines B-Zell Lymphom	ATCC, Rockville, USA

Tabelle T3: Übersicht der verwendeten Zelllinien unter Angabe des Kulturmediums, einer Kurzbeschreibung und ihrer Herkunft.

### III.3. Medien und Lösungen

#### III.3.1. Zellkulturmedium

Für die Kultur der Zellen wurde - sofern nicht anders beschrieben - Clicks' RPMI 1640 Instantmix (Seromed Biochrom, Berlin) verwendet, dem folgende Substanzen zugesetzt wurden:

HEPES-Puffer (Hydroxyethylpiperazinethansulfansäure) (Seromed Biochrom, Berlin)	2,4 g/l
Bicarbonat (Seromed)	1,2 g/l
Antibiotika (Seromed): Penicillin G	1 µg/ml
Tyrosintartrat	1 µg/ml
Streptomycinsulfat	100 µg/ml
L-Glutamin (Seromed)	10 mM
2-Mercaptoethanol (Sigma, München)	$5 \times 10^{-5}$ M
Indometacin (Sigma)	1 µg/ml
FKS (Seromed)	10% (vol/vol)

Das Zellkulturmedium wurde auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt, durch einen 0.2 µm Filter steril filtriert und bei 4°C gelagert.

#### III.3.2. Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

Phosphat gepufferte Salzlösung (Instantmix: 4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 20 mM KCl, pH 7,4) wurde von Seromed bezogen und mit Calcium und Magnesium-Zusatz (0,1 g/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; 0,1 g/l CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O) verwendet.

Für Waschschriffe wurde dem PBS noch zusätzlich 2% (vol/vol) FKS beige-mengt.

### III.3.3. Paraformaldehyd-Fixierlösung

1 g Paraformaldehyd (Sigma, München) wurde in 100 ml PBS bei 56°C unter Rühren über Nacht gelöst. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

### III.3.4. Eosin Lösung

2 g Eosin (Merck, Darmstadt), 250 mg Natriumazid (Sigma, München) und 50 ml FKS wurden in 450 ml Natriumchloridlösung gelöst, filtriert, portioniert und nicht steril bei 4 °C gelagert. Eosin wurde zum Anfärben der Zellen in Neubauer Zählkammern in den Verdünnungen 1:1 oder 1:10 eingesetzt.

### III.3.5. Fötale Kälberserum (FKS)

FKS (mykoplasmenfrei) wurde über Seromed, Berlin bezogen. Vor Benutzung wurde es bei 56°C für 30 Min im Wasserbad hitzeinaktiviert, portioniert und bei -20°C gelagert.

### III.3.6. Ficoll 1,077

Die Ficoll 1,077 Lösung wurde verwendet, um lebende aktivierte Zellen von toten und ruhenden Zellen zu trennen. 3 ml Zellsuspension wurden mit 2 ml Ficoll ( $\delta = 1,077$ ) (Seromed, Berlin) unterschichtet und bei 1000 x g 20 Minuten bei 22 °C zentrifugiert. Die sich in der Trennschicht zwischen Zellsuspension und Ficoll ansammelnden Zellen wurden mit einer Pipette abgenommen.

Lagerung: Stammlösung 4°C, steril

Gebrauchslösung Raumtemperatur, steril, lichtgeschützt

## III.4. Mitogene Substanzen und Wachstumsfaktoren

### III.4.1. Interleukin-2 (IL-2)

Humanes rekombinantes Interleukin-2 (IL-2) (Eurocetus, Amsterdam, Niederlande) wurde als Wachstumsfaktor in Lymphozytenkulturen eingesetzt.

Lagerung: Stammlösung 30000 U/ml, steril, -20°C

Gebrauchslösung 1000 U/ml steril, 4°C

### III.4.2. Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)

Staphylokokken Enterotoxin B wurde von Sigma, München bezogen, in einer Konzentration von 1 mg/ml mit PBS gelöst und bei 4°C steril gelagert.

### III.4.3. Concanavalin A (Con A)

1 mg Concanavalin A (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurden in 1 ml Click's RPMI Medium gelöst und bei 4°C gelagert.

### III.4.4. Lipopolysaccharid (LPS)

1 mg Lipopolysaccharid (Sigma, München) wurden in 1 ml PBS gelöst und bei 4°C gelagert.

### III.4.5. Ovalbumin

1 mg Hühner-Ovalbumin (Sigma, München) wurde in 1 ml PBS gelöst, zentrifugiert, der Überstand steril (0.2 µM, Anotop) filtriert und sofort zur Immunisierung der Mäuse verwendet.

### III.4.6. Ionomycin

1 mg Ionomycin (Sigma, München) wurde in 1 ml DMSO (Sigma, München) gelöst, portioniert und bei -20°C gelagert.

### III.4.7. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)

1 mg Phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma, München) wurde in 1 ml DMSO (Sigma, München) gelöst, portioniert und bei -20°C gelagert.

## III.5. Antikörper

### III.5.1. Rabbit anti syrian Hamster IgG

Dieser Antikörper wurde für das Coating von 96 Well U-Boden Platten verwendet (siehe III.9.5), und in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.



## III.5.2. Biotin markierte Antikörper

<i>Spezifität</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Hersteller</i>
<b>CD28</b>	1 µg/ml	Pharmingen, Hamburg
<b>IL-2</b>	siehe III.10	Pharmingen, Hamburg

Tabelle T4: Übersicht der verwendeten Biotin markierten Antikörper.

## III.5.3. Fitc markierte Antikörper

<i>Spezifität</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
<b>Vβ8.1-8.3</b>	1:100	Dr. M. Bevan, Scripps Institute, CA, USA.
<b>CD69</b>	1:100	Pharmingen, Hamburg
<b>B220</b>	1:100	Pharmingen, Hamburg
<b>CD4</b>	1:100	Pharmingen, Hamburg

Tabelle T5: Übersicht der verwendeten Fitc markierten Antikörper.

## III.5.4. Phycoerythrin (PE) markierte Antikörper

<i>Spezifität</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
<b>CD25</b>	1:50	Pharmingen, Hamburg
<b>CD28</b>	1:50	Pharmingen, Hamburg
<b>CD4</b>	1:50	Pharmingen, Hamburg
<b>CD8</b>	1:50	Pharmingen, Hamburg

Tabelle T6: Übersicht der verwendeten PE markierten Antikörper.

## III.5.5. Unmarkierte Antikörper

<i>Spezifität</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Hersteller</i>
<b>CD28</b>	1 µg/ml	Pharmingen, Hamburg
<b>IL-2</b>	siehe III.10	Pharmingen, Hamburg

Tabelle T7: Übersicht der verwendeten unmarkierten Antikörper

## III.5.6. Sonstige Antikörper

<i>Spezifität</i>	<i>Hybridom</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Herkunft</i>
<b>CD3e</b>	145-2C11	siehe III.9.5	Dr.J. Bluestone, NIH, Bethesda, USA
<b>CD4</b>	GK 1.5	siehe III.9.4	Dr.F.Fitch, University of Chicago, USA
<b>CD8</b>	53-67.2	siehe III.9.4	Pharmingen, Hamburg
<b>IL-2</b>	S4B6	10 µg/ml	
<b>IL-4</b>	11B11	10 µg/ml	

Tabelle T8: Übersicht der sonstigen verwendeten Antikörper

### III.6. Zusätzliche Reagenzien für die Durchflusszytometrie

#### III.6.1. Propidiumjodid

Propidiumjodid (Sigma, München) wurde in PBS gelöst (1 mg/ml).

#### III.6.2. Fluo-3 acetoxymethylester

50 µg Fluo-3-acetoxymethylester (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) wurden in 100 µl DMSO (Sigma, München) unmittelbar vor Gebrauch gelöst.

### III.7. Polyanionische Substanzen Heparin, Dextransulfat und Fucoidan

Heparin wurde als Heparin Na 25000<sup>®</sup> Ratiopharm (Ratiopharm, Ulm) bezogen. Dextransulfat-Na und Fucoidan wurden von Sigma, München bezogen und unmittelbar vor Gebrauch in Click's RPMI Medium angesetzt.

### III.8. Oligodesoxyribonukleotide (ODN)

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden als Phosphorothioat Oligonukleotide von TIB Molbiol, Berlin synthetisiert. Die lyophilisierten ODN wurden in ultrapurem Wasser (Seromed, Berlin) 30 Minuten bei 56°C gelöst, auf 250 µM verdünnt, steril filtriert (Anatop 0.2 µM, Whatman, England) und portioniert.

<b>ODN</b>	<b>Sequenz</b>
<b>GR1</b>	5' - TTG GAG GGG GTG GTG GGG - 3'
<b>GR1c</b>	5' - CCC CAC CAC CCC CTC CAA - 3'
<b>GR1.1</b>	5' - TTG GAG TAG GAA TTC AAT C - 3'
<b>GR1.2</b>	5' - AGA TTT CGG GGT GTT CAA TC - 3'
<b>GR1.3</b>	5' - AGA TTT CTA GGA AGT GGG G - 3'
<b>GR1.12</b>	5' - TTG GAG GGG GTG TTC AAT C - 3'
<b>GR1.13</b>	5' - TTG GAG TAG GAA GTG GGG - 3'
<b>GR1.23</b>	5' - AGA TTT CGG GGT GGT GGG G - 3'
<b>1668</b>	5' - TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT - 3'
<b>T7ap</b>	5' - GGG GTT GTG GGC GGG GTT - 3'
<b>CRE</b>	5' - GAT TGC CTG ACG TCA GAG AG - 3'
<b>1628</b>	5' - GGG GTC AAC GTT GAG GGG GG - 3'
<b>1720</b>	5' - TCC ATG AGC TTC CTG ATG CT - 3'
<b>Stat5</b>	5' - AGA TTT CTA GGA ATT CAA TC - 3'

Tabelle T9: Übersicht der verwendeten Oligodesoxyribonukleotide

### III.9. Zellgewinnung und Kulturbedingungen

#### III.9.1. Gewinnung von Lymphknotenzellen

6-8 Wochen alte weibliche Mäuse wurden durch zervikale Dislokation oder CO<sub>2</sub> Gas getötet, die mesenterialen und inguinalen Lymphknoten entnommen und durch ein 100 µM Metallsieb gedrückt. Die Zellen wurden in PBS/2% FKS aufgenommen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt wurde nochmals wiederholt, das Zellpellet anschließend in 10 ml PBS/2% FKS aufgenommen. 20 µl der Zellsuspension wurden 1:1 mit Eosin Färbelösung verdünnt und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl pro ml bestimmt.

#### III.9.2. Gewinnung von Milzzellen

Die entnommene Milz wurde durch ein 100 µM Metallsieb gedrückt, die Zellen in PBS/2% FKS aufgenommen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 3 ml 0.14 M NH<sub>4</sub>Cl Lösung für 10 Minuten bei RT zur Lyse der Erythrozyten inkubiert. Anschliessend folgten zwei Waschschritte mit PBS/2% FKS, die Zellen wurden dann in 10 ml PBS/2% FKS aufgenommen. 20 µl der Zellsuspension wurden 1:10 mit Eosin Färbelösung verdünnt und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl pro ml bestimmt.

#### III.9.3. Herstellung von Concanavalin A aktivierten T-Zellblasten

Es wurden 50 x 10<sup>6</sup> Milzzellen mit 75 µg Concanavalin A in 50 ml Click's RPMI/10 % FKS für 48 bis 72 Stunden inkubiert, danach mit einem Ficoll-Dichtegradienten ( $\delta=1.077$ ) die blastösen Zellen von den ruhenden und toten Zellen getrennt, zwei mal mit PBS/2% FKS gewaschen und in 10 ml Kulturmedium aufgenommen.

### III.9.4. Isolierung von T-Lymphozyten und CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Subpopulationen mittels magnetischer Separierung

Aus Einzelzellsuspensionen von Lymphknotenzellen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit 10  $\mu$ l Dynabeads Schaf-anti-Maus IgG (Dynal, Oslo, Norwegen) in 1 ml PBS/2% FKS für 30 min unter dauerndem Aufschütteln auf Eis inkubiert. Mit dem an magnetische Beads gekoppelten Antikörper wurden die B-Zellen aus der Lymphknotenpopulation depletiert, indem die Zellsuspension in einen Magnethalter gebracht wurde. Die mit Beads markierten Zellen sedimentieren an der Röhrchenwand, die übrigen Zellen können als Überstand entnommen werden. Die Reinheit der so gewonnenen T-Zellpopulation wurde mittels FACS-Analyse bestimmt, und lag zwischen 90 und 95%.

Zur Gewinnung von CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Concanavalin A aktivierten T-Zellblasten wurden diese zunächst, wie oben beschrieben, von B-Zellen befreit, dann wurden je  $10^7$  Zellen mit 15  $\mu$ g Ratte-anti-Maus CD4 oder 15  $\mu$ g Ratte-anti-Maus CD8 in 1 ml PBS/2% FKS bei 4°C für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/2% FKS wurden  $10^6$  Zellen mit 10  $\mu$ l Dynabeads Schaf-anti-Ratte IgG (Dynal, Oslo, Norwegen) in 1 ml PBS/2% FKS für 30 min unter dauerndem Aufschütteln auf Eis inkubiert. Die magnetische Separierung erfolgte dann wie oben beschrieben. Die Anreicherung der CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Zellen lag bei über 95%.

### III.9.5. Koppelung von Antikörpern an Zellkulturplatten

Zunächst wurden 96 Well Zellkulturplatten (Nunc, Wiesbaden) mit Rabbit-anti-syrian Hamster IgG in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml mit 150  $\mu$ l pro Well über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Überstände wurden abgesaugt, und die Platten 2 mal mit PBS gewaschen. Dann wurden entweder syrian Hamster-anti-Maus CD3 allein oder zusammen mit syrian Hamster-anti-Maus CD28 in einer Konzentration von je 1  $\mu$ g/ml mit 200  $\mu$ l pro Well über Nacht bei 4°C auf die Platten gekoppelt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellkulturplatten mit Click's RPMI/10 %FKS für 3 Stunden abgesättigt und dann sofort mit den Proben beladen.

### III.9.6. Kulturbedingungen

Die Zellkulturen wurden immer in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Für Proliferationsassays und zur FACS Analyse wurde die Zellkultur in 96 Well U Boden Platten durchgeführt. Für Zytokinnachweis (ELISA) und die Zellzyklusanalyse wurden die Ansätze in 24 Well Platten gemacht.

### III.10. Elisa zum Nachweis von murinem Interleukin 2

Der Capture Antikörper Anti - IL-2 wurde in Coating-Puffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pH 9.6) auf Nunc Maxisorb Immunoplates mit 50 µl/well in einer Konzentration 2 µg/ml aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS/0.05% Tween 20 (Sigma, München) wurde mit PBS/10% FKS mit 200 µl pro Well für 2 Stunden bei RT geblockt. Anschliessend wurde 3 mal mit PBS/0.05% Tween 20 gewaschen und die Proben und der Standard in je 100µl Medium aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Standard wurde rekombinantes murines IL-2 von Pharmingen, Hamburg benutzt und in einer Anfangskonzentration von 50 ng/ml eingesetzt. Es folgten 3 Waschschriffe mit PBS/0.05% Tween 20, danach wurde 1µg/ml Detektor Antikörper Biotin-Anti Maus IL-2 mit in PBS/10% FKS mit 100 µl pro Well für 2h bei RT inkubiert. Anschliessend 3 mal waschen mit PBS/0.05% Tween 20, danach ExtrAvidin-Peroxidase (Sigma, München) 1:800 in PBS/10% FKS verdünnen und mit 100 µl pro Well für 1h bei RT inkubieren. Nach wiederum 3 Waschschriffen erfolgte die Zugabe der Substratlösung; (o-phenylendiamin-Dihydrochlorid (OPD))Tabletten (Sigma München), welche in Aqua bidest. gelöst wurden und mit 100 µl pro well eingesetzt wurden. Nach 10 – 15 min Entwicklungszeit bei RT und im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 µl 0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Well gestoppt und die Extinktion am Elisa-Reader (Molecular Devices) bei 450 nm Wellenlänge gemessen.

### III.11. Fluoreszenzfärbungen und Durchflusszytometrie

#### III.11.1. Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie lassen sich neben Zellgröße, Granularität auch mit Hilfe von an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte Antikörper Oberflächenstrukturen spezifisch darstellen. Dabei wird der Farbstoff jeweils mit Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, selbst Licht zu emittieren, welches detektiert wird. Die Messungen wurden an einem Epics XL Durchflusszytometer (Coulter, Krefeld) durchgeführt und es wurden je nach Analyse zwischen  $10^4$  –  $10^5$  Zellen analysiert.

#### III.11.2 Direkte Immunfluoreszenzfärbung

$0.5 - 1 \times 10^6$  Zellen werden in 96 Well V-Bodenplatten (Nunc, Wiesbaden) mit den Fitc, PE oder Biotin markierten Antikörpern in 100  $\mu$ l pro Well für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach folgen zwei Waschschriffe mit PBS/2% FKS, anschliessend werden die Zellen in 250  $\mu$ l 1% PFA Lösung fixiert.

#### III.11.3. Messung von intrazellulären $Ca^{2+}$ Spiegeln mit Fluo-3 AM

$10^6$  isolierte T-Lymphozyten wurden für 15 min bei 37°C mit 1  $\mu$ g Fluo-3AM (Molecular Probes, Leiden) in 1 ml PBS/2% FKS inkubiert, dann zweimal mit PBS/2% FKS gewaschen. Diesem "loading" der Zellen mit dem Farbstoff folgte danach die Beladung mit Ak gegen CD3 und/oder CD28. Dazu wurden  $10^6$  Zellen mit 5  $\mu$ g des jeweiligen Ak in 1 ml PBS/2% FKS bei 4°C 30 min inkubiert, anschliessend zweimal mit PBS/2% FKS gewaschen. Sofort danach wurden die Proben dann am EPICS XL Durchflusszytometer vermessen. Der Farbstoff wurde mit Laserlicht der Wellenlänge  $\lambda = 488$  nm angeregt, und die Fluoreszenz bei  $\lambda = 525$  nm detektiert. Es wurde jeweils zwischen 3 und 5 Minuten gemessen.

### III.12. Zellzyklusanalyse

Die Progression von Zellen durch den Zellzyklus und der damit verbundene Anstieg des DNA-Gehalts von diploid auf tetraploid kann mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt werden. Propidiumjodid (PJ) interkaliert in die DNA Stränge und emittiert nach Anregung Licht, das bei 480 nm Wellenlänge gemessen werden kann (Ormerod, 1989).

1 – 5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden zunächst mit 1 ml eiskaltem 70% Ethanol versetzt und anschliessend 45 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden dann zentrifugiert und zweimal mit PBS/2% FKS gewaschen und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde zusammen mit 50 µl RNase A (1mg/ml), 50 µl Propidiumjodid (1mg/ml) und 400 µl PBS/2% FKS für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde die Fluoreszenz von PJ bei 488 nm am Durchflusszytometer Epics XL gemessen.

### III.13. Immunisierung mit Ovalbumin und <sup>51</sup>Cr-Zytotoxizitätstest

#### III.13.1. Immunisierung von Mäusen mit Ovalbumin

C57Bl/6 Mäuse wurden subkutan in beide Hinterpfoten mit 50 µl der Ovalbuminlösung immunisiert. Als Adjuvans wurde einigen Mäusen 7 Tage vorher 10 nmol des Oligonukleotids 1668 injiziert (Lipford et al., 1997). 4 Tage nach der Immunisierung wurden die poplitealen und inguinalen Lymphknoten entnommen und für weitere 4 Tage mit Zusatz von 10 U/ml Interleukin-2 in Click's RPMI/10% FKS kultiviert. Dann wurden die blastösen Zellen für den Zytotoxizitätsassay verwendet.

#### III.13.2. <sup>51</sup>Cr-Zytotoxizitätstest

Anhand der spezifischen Lyse wird erfasst, ob und in welchem Ausmass Ovalbumin induzierte zytotoxische T-Lymphozyten ihre Zielzellen lysieren. Diese Zielzellen sind mit Peptid beladen und werden von den Effektorzellen erkannt und lysiert. Nicht beladene Zellen werden nicht erkannt und nicht lysiert. EL4 und EG-7 Zielzellen wurden mit 14 MBq Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>-Lösung 90 min bei 37°C gelabelt und anschliessend gewaschen. EL4 Zielzellen wurden danach für 45

min bei 37°C mit der Peptidlösung inkubiert und wieder 2 mal gewaschen. In einer 96 Well V-Boden Mikrotiterplatte werden die Effektorzellen in verschiedenen Verdünnungen als Dreifachbestimmungen in einem Volumen von 100 µl vorgelegt. Dazu werden  $1 \times 10^3$  Zielzellen in 100 µl pipettiert. Die Kontrollgruppen sind Zielzellen ohne Effektorzellen (=Spontanlyse) und Zielzellen ohne Effektorzellen, welche beim Abnehmen des Überstands stark verwirbelt wurden (=Maximallyse). Die Mikrotiterplatten wurden 4h bei 37°C inkubiert. Dann wurden 100 µl Überstand abgenommen. Die Menge an freigesetztem Chrom wurde in counts per minute (cpm) an einem  $\gamma$ -Counter (Packard, Frankfurt) gemessen. Die Ergebnisse werden in Prozent spezifische Lyse ausgedrückt.

Die spezifische Lyse der zytotoxischen T-Lymphozyten wird nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{Probe cpm} - \text{Spontan cpm}}{\text{Maximal cpm} - \text{Spontan cpm}} \times 100$$

### III.14. Proliferationsassay

Die Wachstumsrate von Zellen korreliert mit dem Einbau von Thymidin in die DNA. Ist dieses Thymidin als  $^3\text{H}$ -Thymidin radioaktiv markiert, so lässt sich dieser Einbau messen. Zellkulturen in 96 Well Mikrotiterplatten wurden mit 20 µl 14.8 kBq  $^3\text{H}$ -Thymidin je Well für 6-8h gepulst. Die Platten wurden danach bei -20°C gefroren, wieder aufgetaut und mit einem Zellharvester (Inotech, Dottikon, Schweiz) auf Glasfaserfilter (Dunn, Asbach) aufgetragen und anschliessend an einem Matrix 96 Counter (Packard Instruments, Meriden, CT, USA) in counts per minute (cpm) gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus 4 individuellen Bestimmungen berechnet.



## IV. Eigene Ergebnisse

### IV.1. Einfluss guaninreicher ODN auf murine T-Lymphozyten unter den restriktiven Bedingungen einer reinen TZR Stimulation

Dem hier verwendeten in vitro Modell zur Untersuchung von T-Zellen liegt die 2 Signaltheorie der T-Zellaktivierung zugrunde. Bei der Interaktion des T-Lymphozyten mit einer antigenpräsentierenden Zelle wird das Signal 1 über den T-Zellrezeptor und das Signal 2 über kostimulatorische Rezeptoren wie CD28 vermittelt. In diesem System gelten folgende Regeln für den T-Lymphozyten (modifiziert nach (Matzinger, 1994)):

1. Reagiere nicht auf das Signal 1 in Abwesenheit von Signal 2!
2. Reagiere auf Signal 2 nur in Anwesenheit von Signal 1!

Eine T-Zelle empfängt also nur dann ein positives Signal zur Proliferation und weiteren Differenzierung, wenn der TZR im Kontext eines geeigneten Kostimulus angeregt wird.

Die Erfassung kostimulatorischer Aktivität erfordert die strikte Trennung beider Signale im Versuchsaufbau.

Erste Voraussetzung hierfür ist, dass man ein von antigenpräsentierenden Zellen freies System verwendet. Dies wird durch die Depletion der APZ aus den primären murinen Lymphknotenzellpopulationen erreicht.

Diesen angereicherten T-Zellen wird nun mittels monoklonaler Ak gegen den TZR/CD3 Komplex ein TZR Signal gegeben. Da sich keine APZ in der Kultur befinden, fehlt nun das Signal zwei und die angereicherte T-Zellpopulation wird erst dann proliferieren, wenn dieses entweder durch die erneute Hinzugabe von APZ oder zusätzliche monoklonale AK gegen CD28 wieder rekonstituiert wird.

## IV.1.1.a. Proliferation

Abb. 4.1. stellt die Proliferation angereicherter muriner T-Zellen in dem beschriebenen APZ - freien System dar. Die hohe Empfindlichkeit des Systems für kostimulatorische Signale und damit die funktionelle Wiedergabe des 2 Signalmodells zeigt sich darin, dass sich bei Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 Ak (Signal eins) alleine nur sehr geringes Wachstum registrieren lässt, dieses jedoch bei gleichzeitiger Gabe von  $\alpha$ -CD28 Ak (Signal zwei) in dramatischer Weise gesteigert wird (siehe Abb.4.1.d).

Ferner zeigt sich, dass das ODN GR1 keinen direkten Effekt auf ruhende T-Zellen hat (4.1.a.), auch die Stimulation mit  $\alpha$ -CD28 (Signal Zwei) führt in Kombination mit dem ODN zu keinem Effekt (4.1.b.). Erhalten die Zellen jedoch mittels  $\alpha$ -CD3 einen TZR Stimulus, so zeigt sich dosisabhängig eine deutliche Steigerung der Proliferation (4.1.c.) durch das ODN GR1, die bei 1  $\mu$ M um den Faktor 10 höher ist als bei alleiniger Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 und etwa die Hälfte einer  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Stimulation erreicht (4.1.d.). Zu beachten ist ferner, dass sich dieser deutliche kostimulatorische Effekt bei 10  $\mu$ M verliert (4.1.c).

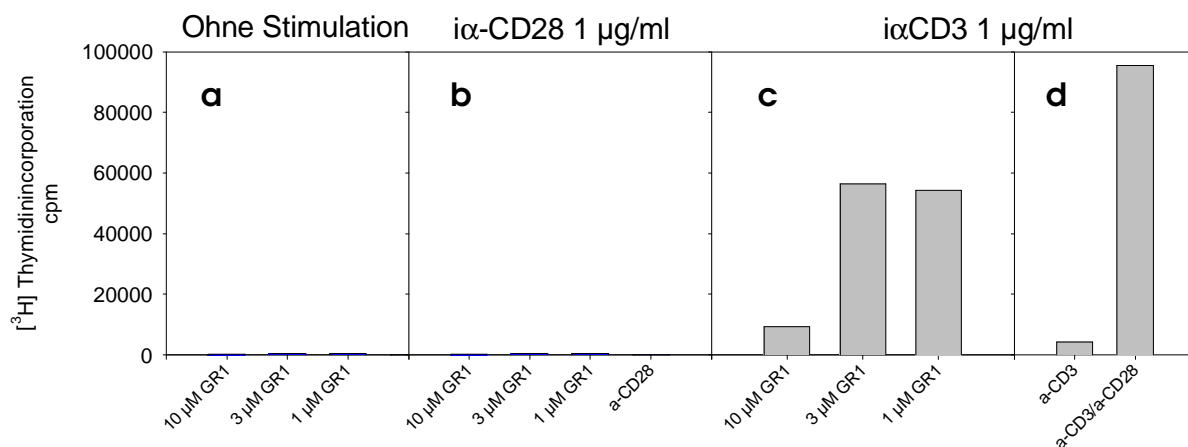


Abb. 4.1.a.-d. Proliferation  $\alpha$ -CD3 getriggelter T-Lymphozyten. Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3<sup>+</sup> Zellen) wurden mit 10<sup>4</sup> Zellen/well in mit  $\alpha$ -CD3 oder  $\alpha$ -CD28 Ak gecoateten Zellkulturplatten für 72h inkubiert. Das ODN GR1 wurde in absteigender Konzentration zugegeben. Für die letzten 6h wurde der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt.

## IV.1.1.b. CD25 Expression

Ein wichtiges Ereignis nach Aktivierung von T-Lymphozyten ist die gesteigerte Expression von CD25, der IL-2 Rezeptor  $\alpha$ -Kette, welche mit den  $\beta$  und  $\gamma$  Untereinheiten den hochaffinen Interleukin-2 Rezeptor bildet. Abb. 4.2. zeigt die Expression von CD25 nach Applikation verschiedener Stimuli.

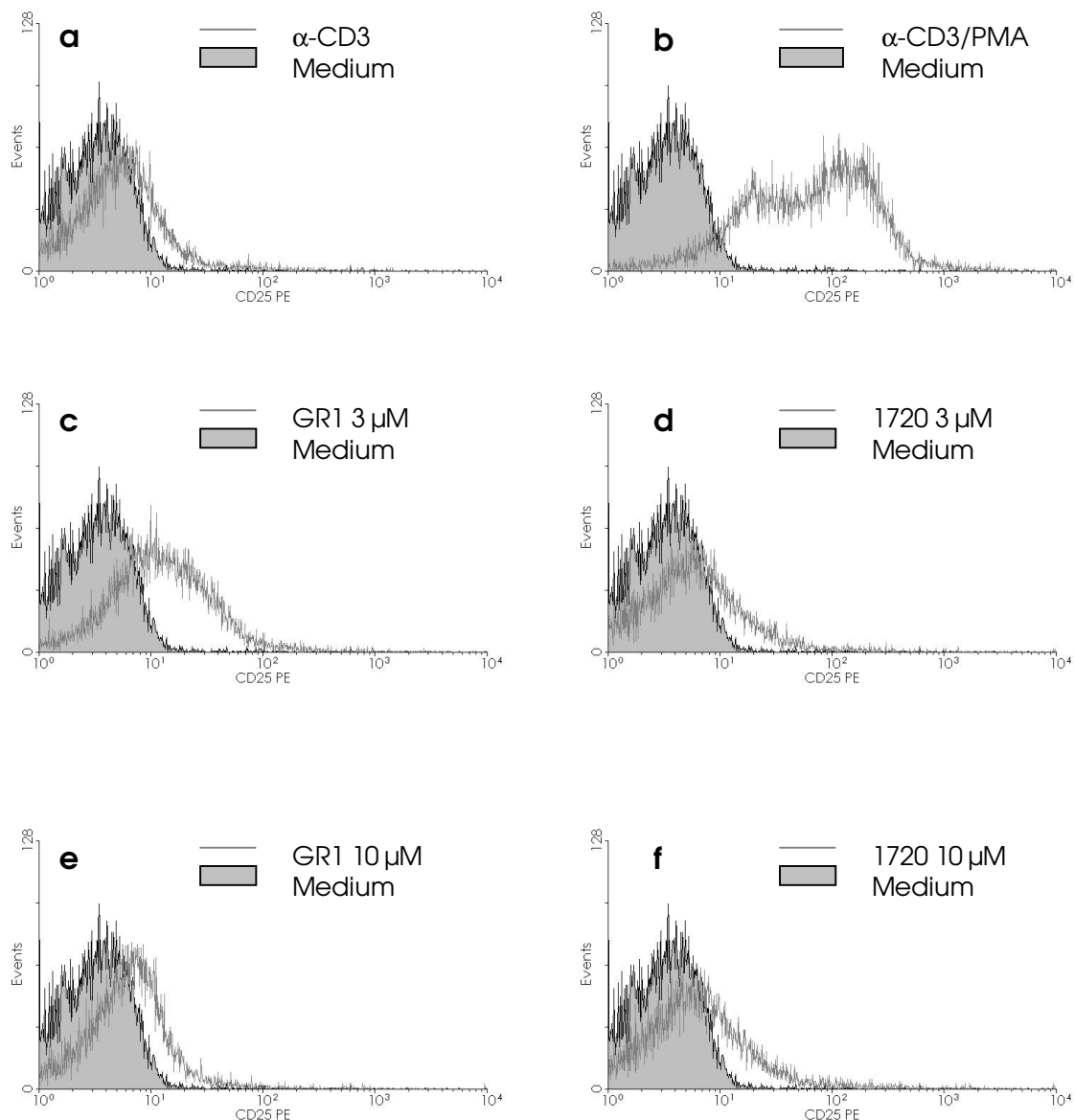


Abb. 4.2.a-f. CD25 Expression. Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3<sup>+</sup> Zellen) wurden mit  $10^6$  Zellen/well in mit  $\alpha$ -CD3 gecoateten 24 Well Platten für 24h inkubiert. Die ODN GR1 oder 1720 wurden in Konzentration von 3 bzw. 10  $\mu$ M zugegeben. Zur Darstellung wurden jeweils  $10^4$  Ereignisse miteinbezogen.

Nach dem Quervernetzen von  $\alpha$ -CD3 findet nur eine sehr geringe Veränderung der CD25 Expression statt (4.2.a.). Bei zusätzlicher Gabe von 100

ng/ml PMA zeigt sich eine deutliche Steigerung der Expression (4.2.b.). Das ODN GR1 steigert in der Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  ebenso die CD25 Expression, wenn auch in geringerem Ausmass (4.2.c.). Das nicht guaninreiche ODN 1720 führt bei gleicher Dosis zu keiner entsprechenden Wirkung (4.2.d.). Ebenso sind hohe Dosen (10  $\mu\text{M}$ ) beider ODN wirkungslos (4.2.e. und f.).

### IV.1.1.c. IL-2 Produktion

IL-2 ist der wichtigste Wachstumsfaktor für T-Zellen, sein Nachweis korreliert eng mit der Proliferation und dem Aktivierungsgrad. Abb. 4.3. zeigt die IL-2 Produktion mit dem ODN GR1 (4.3.a.) oder 1720 (4.3.b.). Es besteht auch hier eine Dosisabhängigkeit und es ergibt sich das Bild eines durch guaninreiche ODNs erzeugten IL-2 getriebenen Wachstums.

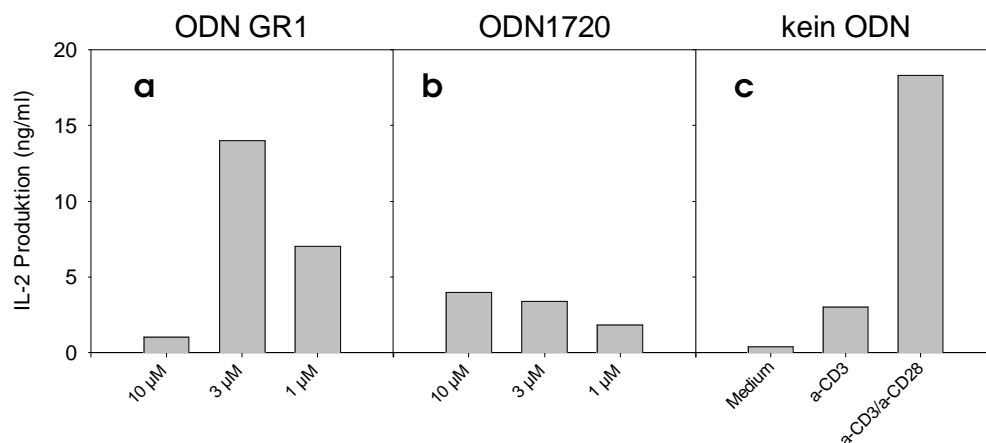


Abb. 4.3. a.-c. Interleukin-2 Produktion. Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3<sup>+</sup> Zellen) wurden mit  $10^6$  Zellen/well in mit  $\alpha$ -CD3 gecoateten 24 Well Platten für 24h inkubiert und dann je 100  $\mu\text{l}$  Überstand abgenommen, welcher unverdünnt in einem murinen IL-2 Elisa eingesetzt wurde. Die ODN GR1 oder 1720 wurden in absteigender Konzentration zugegeben.

## IV.1.1.d. Sequenzvoraussetzungen

Um ermitteln zu können, welche Sequenzelemente des ODN GR1 für die Ko-stimulation wichtig sind, wurden zahlreiche Varianten des ursprünglichen ODN generiert. Diese sind in Tabelle T10 dargestellt.

Dabei wurde der 18 mer in drei Segmente aufgeteilt, welche dann zufällig miteinander verknüpft wurden. Die "Lücken" wurden mit Teilen aus dem ODN Stat5 gefüllt. Ausserdem wurde noch zwei andere ODN mituntersucht.

ODN	Sequenz	G-Gehalt (%)
<b>GR1</b>	5´ - TTG GAG GGG GTG GTG GGG - 3´	72
<b>GR1.1</b>	5´ - <b>TTG GAG</b> TAG GAA TTC AAT C - 3´	26
<b>GR1.2</b>	5´ - AGA TTT <b>CGG GGT GTT</b> CAA TC - 3´	30
<b>GR1.3</b>	5´ - AGA TTT CTA GGA A <b>GT GGG G</b> - 3´	42
<b>GR1.12</b>	5´ - <b>TTG GAG GGG GTG</b> TTC AAT C - 3´	42
<b>GR1.13</b>	5´ - <b>TTG GAG</b> TAG GAA <b>GTG GGG</b> - 3´	55
<b>GR1.23</b>	5´ - AGA TTT C <b>GG GGT GGT GGG G</b> - 3´	58
<b>T7ap</b>	5´ - <b>GGG GTT GTG GGC GGG GTT</b> - 3´	67
<b>CRE</b>	5´ - GAT TGC CTG ACG TCA GAG AG - 3´	35
<b>Stat5</b>	5´ - AGA TTT CTA GGA ATT CAA TC - 3´	10

Tabelle T10: Übersicht der Varianten des ODNs GR1 mit Berücksichtigung ihres Gehalts an Guaninbasen.

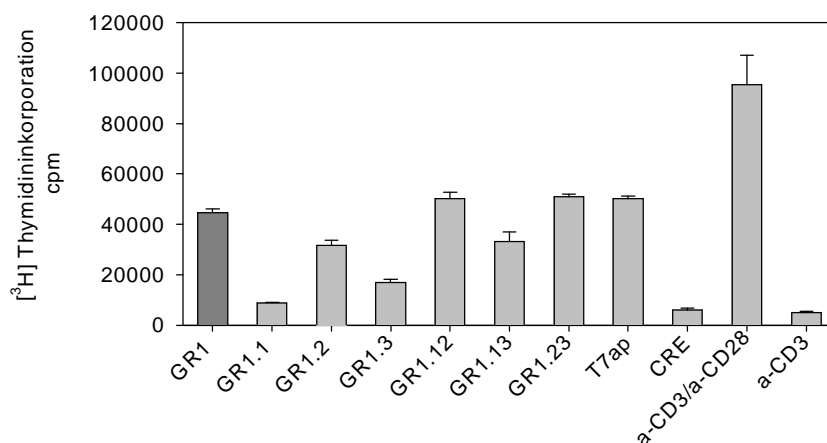


Abb. 4.4. Proliferation α-CD3 getriggertter T-Lymphozyten. Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3+ Zellen) wurden mit 10<sup>4</sup> Zellen/well in mit α-CD3 oder α-CD28 Ak gecoateten Zellkulturplatten für 72h inkubiert. Die ODN Konzentration beträgt 1 μM. Für die letzten 6h wurde der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt.

Die mit den Sequenzvarianten von GR1 erhobenen Daten sind in Abb.4.4. dargestellt. Daraus lässt sich folgendes ableiten:

Die kostimulatorische Aktivität tritt nur bei guaninreichen ODN auf. Hierbei ist jedoch nicht der reine Guaningehalt des ODN entscheidend, sondern die Präsenz einer Reihe von mindestens 4 Guaninbasen (Tetrade).

Zweitens scheint das Vorhandensein 2 solcher Tetraden den ODN Effekt zu begünstigen.

Drittens scheint bei den ODN, welche nur eine Tetrade enthalten, auch die Lage der Tetrade innerhalb der Sequenz oder der Sequenzkontext eine Rolle zu spielen; wenn man z.B. ODN GR1.2 mit GR1.3 vergleicht, zeigt sich, dass die endständige Lage in GR1.3 nur etwa die Hälfte der Aktivität von GR1.2 hat, bei dem die Tetrade in der Mitte liegt.

Die kostimulatorische Aktivität guaninreiche ODN korreliert mit dem Auftreten einer oder mehrerer Tetraden von Guaninbasen.

#### IV.1.2. IL-2 Abhängigkeit

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse war anzunehmen, dass es sich bei der durch ODN GR1 bewirkten Proliferation um ein IL-2 getriebenes Wachstum von T-Zellen handelte. Um dies zu beweisen, wurde einigen Kulturansätzen Überstand des Hybridoms S4B6, welches einen AK gegen murines IL-2 produziert, zugesetzt.

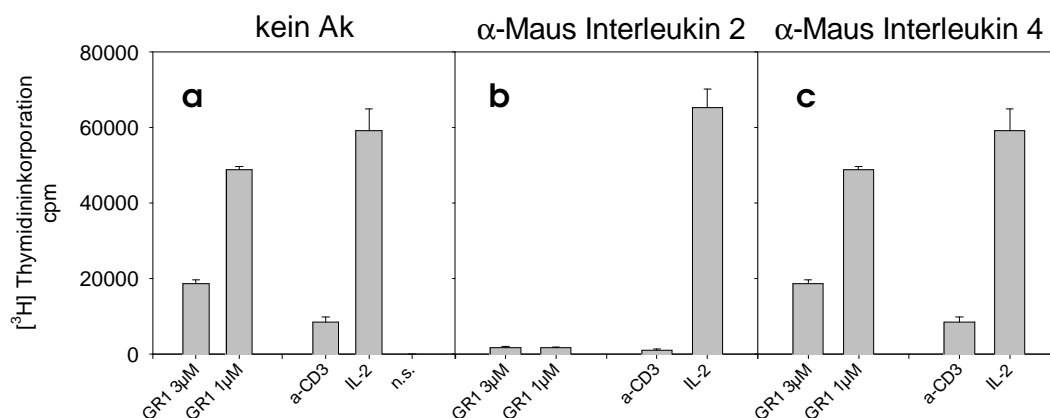


Abb.4.5.a-c. Wirkung von α-IL-2 auf das ODN induzierte Wachstum. Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3<sup>+</sup> Zellen) wurden mit 10<sup>4</sup> Zellen/well in mit α-CD3 Ak gecoateten Zellkulturplatten für 72h inkubiert. Den Ansätzen wurde entweder α-IL-2 Ak (Hybridom S4B6) oder α-IL-4 Ak (Hybridom 11B11) in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit humanem rekombinanten IL-2 (hr IL-2) expandiert wurden. Für die letzten 6h wurde der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt.

Abb. 4.5. zeigt eine klare IL-2 Abhängigkeit des durch GR1 induzierten Wachstums der T-Lymphozyten. Der Ak gegen IL-2 unterdrückt bei einer Konzentration von 10 µg/ml das Wachstum der Zellen um mehr als 90% (4.5.b.). Ein als Kontrolle untersuchter Ak gegen IL-4 ist wirkungslos (4.5.c.), ebenso bleiben mit humanem rekombinantem IL-2 wachsende T-Zellen unbeeinflusst, was unspezifische hemmende Effekte durch die Ak Lösung ausschliesst.

#### IV.1.3. Cyclosporin A Empfindlichkeit

Cyclosporin A ist ein wirksames Immunsuppressivum. Es greift in den Signalweg des TZR ein, indem es als Komplex mit Cyclophilin Calcineurin inaktiviert. Vereinfacht ausgedrückt, sollte Cyclosporin A in dem hier verwendeten  $\alpha$ -CD3 Stimulationssystem das Signal 1 der T - Zellaktivierung "abschalten".

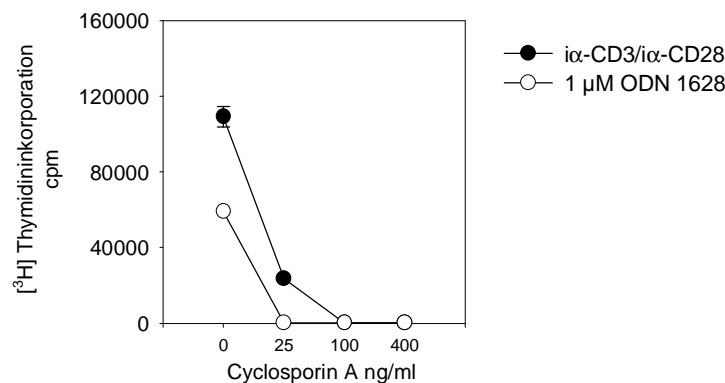


Abb. 4.6. Empfindlichkeit auf Cyclosporin A Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3<sup>+</sup> Zellen) wurden mit 10<sup>4</sup> Zellen/well in mit  $\alpha$ -CD3 Ak gecoateten Zellkulturplatten für 72h inkubiert. Zu den Ansätzen wurde Cyclosporin A in aufsteigender Konzentration gegeben. Als Kontrolle dienten  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 stimulierte T-Zellen. Für die letzten 6h wurde der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt.

Abb.4.6. zeigt, dass mit der pharmakologischen Unterbrechung des TZR Signals die durch guaninreiche ODN bewirkte Proliferation unterdrückt wird, was wiederum die kostimulatorische Wirkungsweise unterstreicht und die Abhängigkeit der ODN Wirkung von einem funktionierenden TZR Signalweg verdeutlicht.

IV.1.4. Wirkung guaninreicher ODN auf CD28 -/- Lymphozyten

In den vorher geschilderten Experimenten hat sich gezeigt, dass die Kostimulation muriner T-Zellen durch guaninreiche ODN phänotypisch der Wirkung, die über CD28 vermittelt wird, sehr ähnlich ist.

Die Wirksamkeit guaninreicher ODN an Zellen einer CD28 knockout Maus zu testen, erschien deswegen als besonders geeignet, um weitere Informationen zu gewinnen. Dieses Experiment sollte vor allem diese Fragen klären:

1. Können guaninreiche ODN in CD28 -/- T-Zellen das CD28 Signal ersetzen?
2. Ist die ODN Wirkung von der CD28 Expression abhängig?

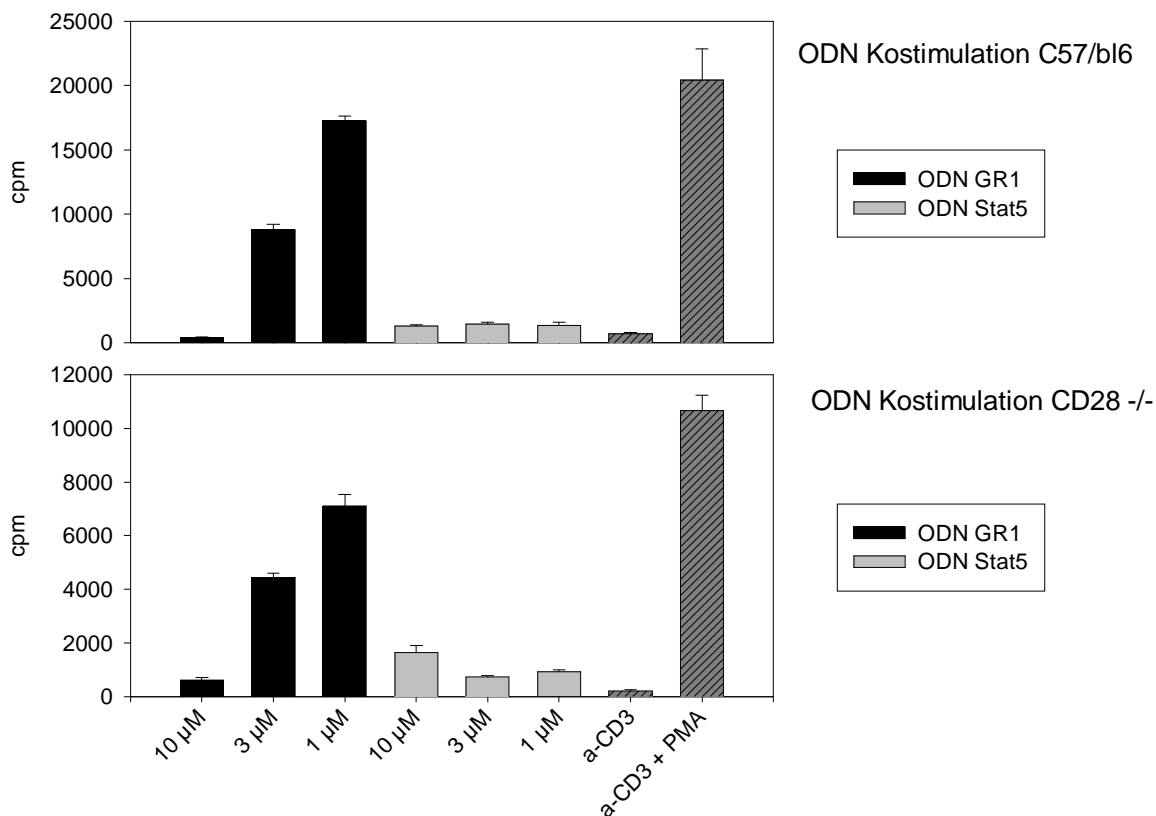


Abb.4.7. Wirkung von guanreichen ODN auf CD28 -/- T-Zellen. Je 10<sup>4</sup> Zellen/well aus Lymphknoten der Wildtyp bzw. CD28 -/- Maus wurden auf α-CD3 gecoateten Kulturplatten für 72h stimuliert. ODN GR1 bzw. Stat5 wurden in verschiedenen Konzentrationen dazugegeben. Für die letzten 6h wurde der (3H) Thymidineinbau bestimmt.

Die erste Frage kann mit „ja“ beantwortet werden: Guaninreiche ODN sind in der Lage T-Zellen, welche kein CD28 exprimieren, effektiv kozustimulieren und damit das CD28 Signal zu ersetzen.



Die zweite Frage muss mit „nein“ beantwortet werden: Die kostimulatorische Wirkung der ODN ist offensichtlich unabhängig von der CD28 Expression.

#### IV.1.5. Konkurrenz mit Polyanionen

Um die ODN vor dem Angriff durch Nukleasen in der Zellkultur zu schützen, werden diese als Phosphorothioatoligonukleotide eingesetzt. Diese Modifikation trägt zur Stabilisierung der ODN bei und verstärkt ihre polyanionischen Eigenschaften. Dieser polyanionische Charakter spielt gerade bei guaninreichen ODN eine grosse Rolle, da diese ausserdem noch die Tendenz haben mit sich selbst zu hybridisieren und so höhere Strukturen über sogenannte Hoogsteen-Basenpaarung zwischen den Guaninbasen ausbilden. In einigen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass die Bindung derartiger Strukturen an Oberflächenproteine wie Mac-1 oder Scavengerrezeptor durch andere Polyanionen kompetitiv hemmbar sind (Benimetskaya et al., 1997; Pearson et al., 1993). Drei verschiedene Polyanionen (Heparin, Fucoidan und Dextran-sulfat) wurden eingesetzt, um die kostimulatorische Wirkung der ODN GR1 und 1628 zu beeinflussen.

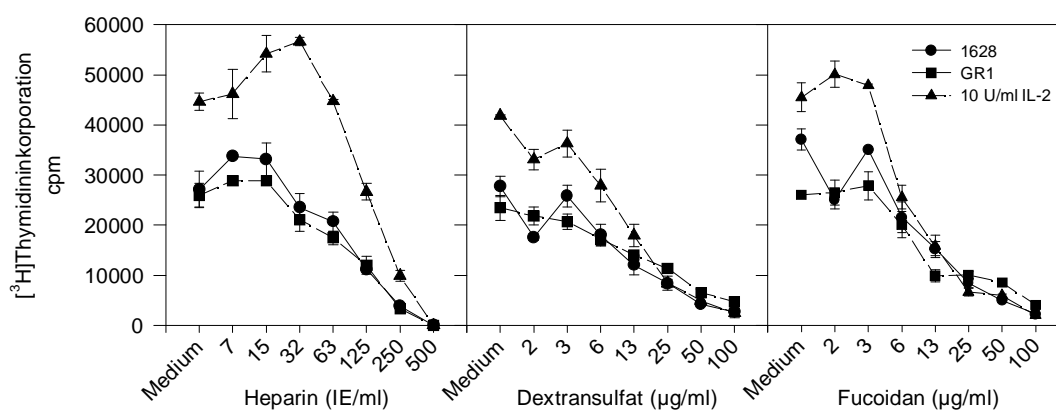


Abb. 4.8. Konkurrenz mit Polyanionen. Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3<sup>+</sup> Zellen) wurden mit 10<sup>4</sup> Zellen/well in mit  $\alpha$ -CD3 Ak ge-coateten Zellkulturplatten für 72h inkubiert. Zu den Ansätzen wurden Heparin, Dextran-sulfat oder Fucoidan in aufsteigender Konzentration gegeben. Als Kontrolle dienten  $\alpha$ -CD3 stimulierte T-Zellen, welche mit 10 U/ml IL-2 versetzt wurden. Für die letzten 6h wurde der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt.

Alle drei polyanionischen Substanzen waren nicht zu einer spezifischen Hemmung der durch GR1 bewirkten T-Zellproliferation in der Lage. In sehr hohen Konzentrationen zeigten sich bei allen dreien eine deutliche Minderung des Zellwachstums. Nach Anfärbung der Zellen mit Eosin war unter dem Mikroskop in diesen Kulturen ein vermehrter Anteil toter Zellen festzustellen. Auch das IL-2 getriebene Wachstum der Kontrolle wurde im gleichen Ausmass reduziert. Zusammengefasst spricht das für eine unspezifische Toxizität, welche entweder durch die Polyanionen oder eventuelle Zusätze in den Zubereitungen bedingt ist.

## IV.2. Einfluss guaninreicher ODN auf die Aktivierung und Proliferation von T - Zellen unter optimalen Stimulationsbedingungen

Die im vorigen Abschnitt beschriebene kostimulatorische Aktivität guaninreicher ODN war beschränkt auf einen sehr engen Konzentrationsbereich von etwa 0.3 bis 3  $\mu\text{M}$ . Die maximal zu beobachteten Proliferationswerte lagen bei ca. 1 bis 2  $\mu\text{M}$  und nahmen bei höheren ODN Dosen kontinuierlich ab. In ähnlich limitierender Weise induzieren guaninreiche ODN auch das Wachstum von Makrophagenvorläufern aus murinem Knochenmark (Lang et al., 1999). Um die Wirkungen der guaninreichen ODN auf T-Lymphozyten bei hohen Konzentrationen studieren zu können, wurden unterschiedliche in vitro T-Zellstimulationsmodelle herangezogen. Im Gegensatz zu den restriktiven Bedingungen einer reinen TZR Stimulation sollten hier die T-Zellen optimal stimuliert werden, um inhibitorische Wirkungen leicht registrieren zu können.

### IV.2.1. Primär stimulierte T-Zellen

#### IV.2.1.a. Mixed lymphocyte reaction (MLR)

Die MLR, zu deutsch gemischte Lymphozytenreaktion, ist ein in vitro Modell der Transplantatabstossung. Bei dieser werden Zellen zweier nicht in ihren Haupthistokompatibilitätsmerkmalen identischer Individuen zusammen kultiviert. Dabei wird die eine Population durch Bestrahlung oder Mitomycin C an der weiteren Teilung gehindert (Stimulatorzellen), die andere reagiert auf die fremden MHC Komplexe der bestrahlten Zellen und die spezifischen T Zellen beginnen zu proliferieren (Responderzellen). In diesem Modell wurden isolierte T Lymphozyten aus einer C57/Bl 6 Maus (H-2K<sup>b</sup>) mit bestrahlten Milzzellen einer Balb/c Maus (H-2K<sup>d</sup>) kokultiviert und die Proliferation über 5 Tage gemessen.

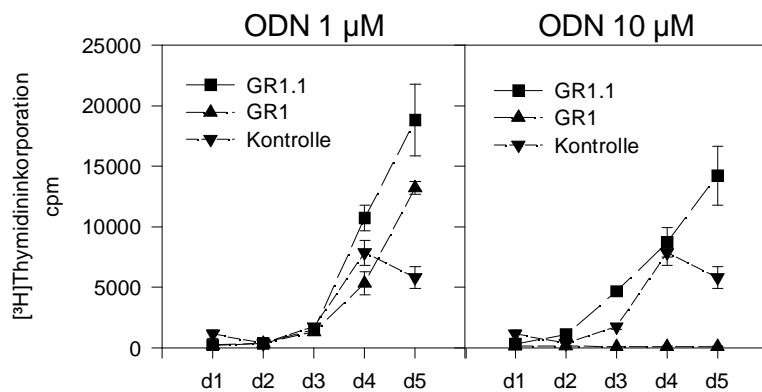


Abb. 4.9. Mixed lymphocyte reaction. Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3<sup>+</sup> Zellen) einer C57/Bl 6 Maus (H-2K<sup>b</sup>) wurden mit  $5 \times 10^4$  Zellen/well zusammen mit  $10^5$  Milzzellen/well einer Balb/c Maus (H-2K<sup>d</sup>) inkubiert. Die Milzzellen wurden vor der Zugabe zur Kultur mit 1500 rad bestrahlt. Die Proliferation wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen erfasst, indem für die letzten 6h der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt wurde.

Das ODN GR1 zeigt in der MLR bei einer Konzentration von 10 µM eine ausgeprägte Hemmung der Proliferation der allogenen stimulierten T-Lymphozyten (Abb. 4.9. rechts). Diese Inhibition ist sequenzabhängig, das Kontrolloligonukleotid zeigt keinen negativen Effekt.

#### IV.2.1.b. Stimulation mit mAk gegen CD3 und CD28

In der MLR werden T-Zellen durch die MHC Komplexe fremder Zellen über ihren TZR stimuliert und so zur Proliferation angeregt. Dabei reagiert nur ein Teil der T-Zellen, nämlich der für die jeweiligen fremden MHC Komplex spezifische. Eine Möglichkeit, um polyklonal T-Zellen anzusprechen, bietet die Quervernetzung mit mAk gegen mit dem TZR assoziierten Oberflächenmolekülen wie CD3, so wie sie bereits in den Versuchen zur kostimulatorischen Wirkung von ODN angewendet wurde. Wird dieses simulierte TZR Signal noch durch eine zusätzliche Quervernetzung des CD28 Oberflächenantigens ergänzt, erhält man einen Maximalstimulus für die Proliferation von T-Lymphozyten.

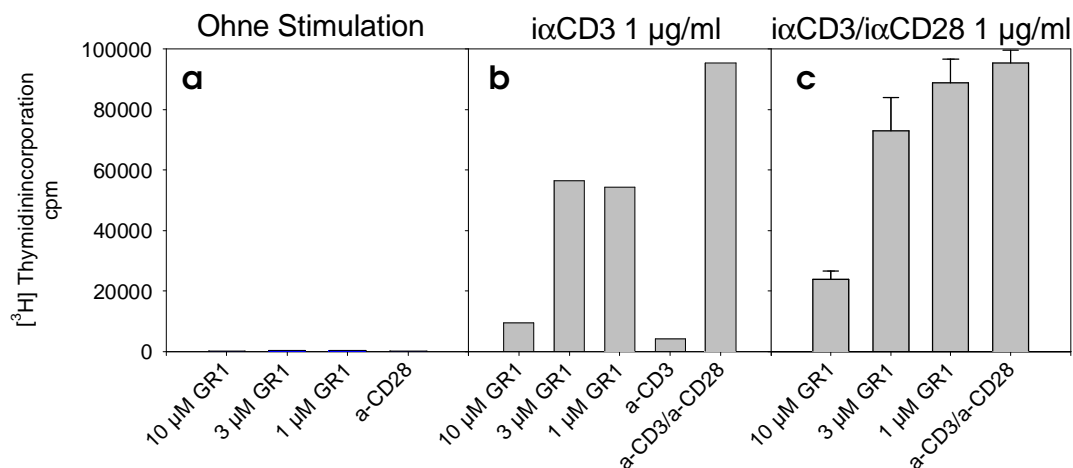


Abb. 4.10.a-c. Proliferation mit  $\alpha$ CD3 und  $\alpha$ CD28. Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3<sup>+</sup> Zellen) wurden mit 10<sup>4</sup> Zellen/well in mit  $\alpha$ -CD3,  $\alpha$ -CD28 oder beiden Ak gecoateten Platten für 72h inkubiert. Das ODN GR1 wurde in absteigender Konzentration zugegeben. Für die letzten 6h wurde der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt.

Wie Abb. 4.10. zeigt, wirkt GR1 unter den Bedingungen einer gleichzeitigen Stimulation mit Ak gegen CD3 und CD28 konzentrationsabhängig inhibitorisch auf die Proliferation der T-Zellen (4.10.c.). In der Konzentration von 10  $\mu$ M ist bei einer Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 auch keine Kostimulation durch GR1 mehr zu beobachten (4.10.b.).

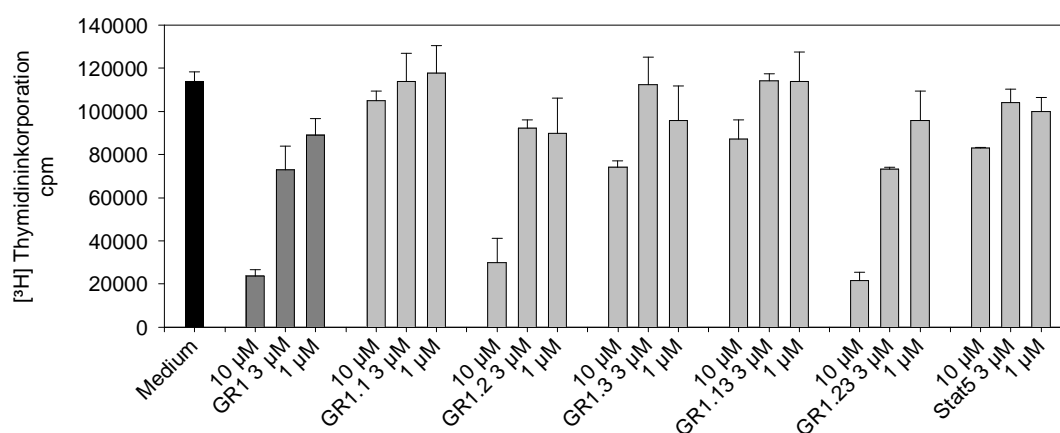


Abb. 4.11. Wirkung von Sequenzvarianten von GR1 auf  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 induzierte Proliferation. Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3<sup>+</sup> Zellen) wurden mit 10<sup>4</sup> Zellen/well in mit  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 Ak gecoateten Platten für 72h inkubiert. Die ODNs wurden in absteigender Konzentration zugegeben. Für die letzten 6h wurde der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt.

Auch bei dem inhibitorischem Effekt auf das Wachstum von T-Lymphozyten wurde mit Hilfe der Sequenzvarianten von GR1 (siehe Tabelle T10) versucht, ein verantwortliches Sequenzmotiv zu finden. In Abb. 4.11. sind die Ergebnisse dargestellt. Ganz offensichtlich sind die ersten 6 Basen am 5´ Ende des ODN GR1 für seine antiproliferative Wirkung entbehrlich. Dies wird durch die fehlende Wirksamkeit von ODN GR1.1 (enthält die ersten 6 Basen der Ursprungssequenz) und die der Ursprungssequenz ebenmässige Wirkung von ODN GR1.23 (enthält die letzten 12 Basen der Ursprungssequenz) nachgewiesen. Auch bei der Inhibition des Wachstums von T-Zellen scheint die Wirksamkeit abhängig zu sein von der Präsenz einer oder besser zwei Tetraden von Guaninbasen in der ODN Sequenz.

### IV.2.1.c. Stimulation mit $\alpha$ -CD3 und PMA

Neben der Stimulation mit Ak gegen CD3 und CD28 besteht die Möglichkeit T-Zellen mit  $\alpha$ CD3 und PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) zu stimulieren. Es sollte untersucht werden, ob GR1 auch unter dieser Stimulation antiproliferativ wirkt.

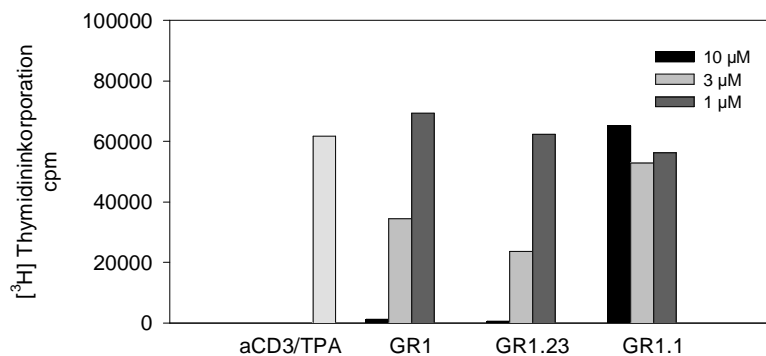


Abb. 4.12. Proliferation mit  $\alpha$ CD3 und PMA. Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3<sup>+</sup> Zellen) wurden mit 10<sup>4</sup> Zellen/well in mit  $\alpha$ -CD3 Ak gecoateten Platten und 200 ng/ml PMA für 72h inkubiert. Das ODN GR1 wurde in absteigender Konzentration zugegeben. Für die letzten 6h wurde der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt.

Aus Abb. 4.12. geht hervor, dass das ODN GR1 auch auf  $\alpha$ -CD3 und PMA stimulierte T-Zellen deutlich wachstumshemmend wirkt. Die Effekte sind dosis- und sequenzabhängig, und ausgeprägter als bei der Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28. Bei etwa 10  $\mu$ M kommt bei  $\alpha$ -CD3 und PMA Stimulation die Proliferation gänzlich zum Erliegen, bei  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 liegt sie immerhin noch bei etwa 20-25% des Kontrollwerts (vgl. Abb. 4.10.c).

#### IV.2.2. Concanavalin A aktivierte T-Zellblasten

Nachdem eine antiproliferative Wirkung von GR1 auf primär aktivierte T-Zellen demonstriert werden konnte, stellte sich die Frage, ob ähnliches auch bei bereits aktivierten T-Zellen zu beobachten wäre. Milzzellen wurden hierzu 2 Tage mit Concanavalin A, einem aus der Familie der Phythämagglutinine stammenden T-Zellspezifischen Mitogen, voraktiviert. Dann wurden die blastösen Zellen gesammelt und weiter mit IL-2 expandiert.

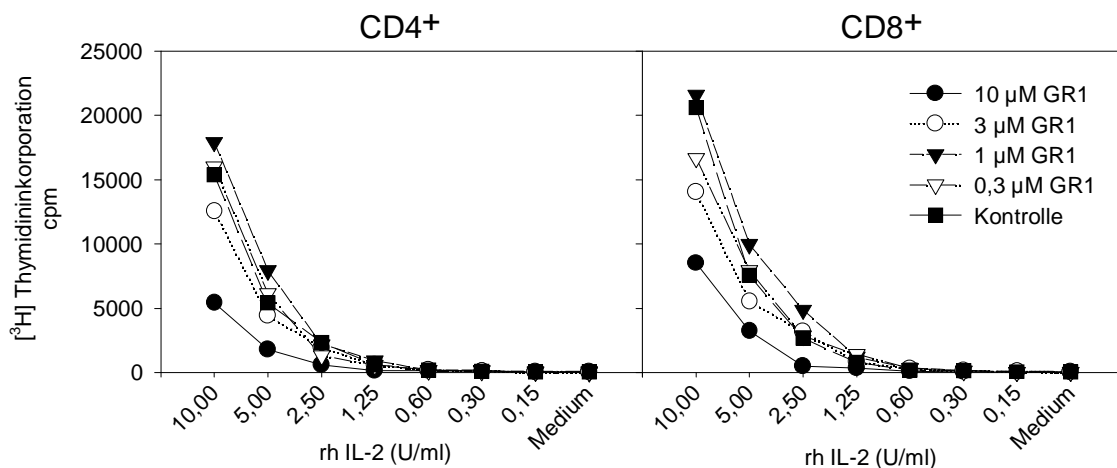


Abb. 4.13. Einfluss von GR1 auf ConA aktivierte T-Zellblasten. ConA aktivierte T-Zellblasten wurden an Tag 2 in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen separiert und für weitere 2 Tage mit absteigenden Konzentrationen von humanem rekombinanten IL-2 expandiert. Das ODN GR1 wurde in absteigender Konzentration zugegeben. Für die letzten 6h wurde der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt.

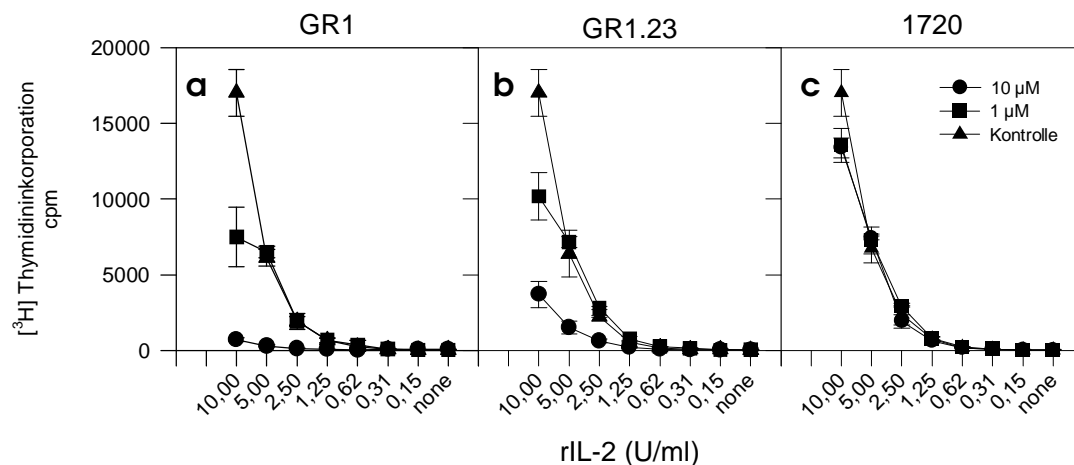


Abb. 4.14.a.-c. Einfluss von GR1 und andere ODN auf ConA aktivierte T-Zellblasten. ConA aktivierte T-Zellblasten wurden an Tag 2 in  $\text{CD4}^+$  Zellen separiert und für weitere 2 Tage mit absteigenden Konzentrationen von humanem rekombinanten IL-2 expandiert. Die ODN wurden in absteigender Konzentration zugegeben. Für die letzten 6h wurde der ( $^3\text{H}$ ) Thymidineinbau bestimmt.

Das IL-2 getriebene Wachstum ConA aktivierter T-Zellen wird durch das ODN GR1 sowohl in der  $\text{CD4}^+$  als auch in der  $\text{CD8}^+$  Subpopulation gehemmt (Abb. 4.13.). Der Effekt ist bei den  $\text{CD4}^+$  Zellen bei gleicher Konzentration von GR1 etwas ausgeprägter. Abb. 4.14. zeigt, dass auch hier die Präsenz von 2 Guanintetraden ODN von Bedeutung ist, wenn man GR1.23 (4.14.b.) mit dem ODN1720 (4.14.c.) vergleicht.

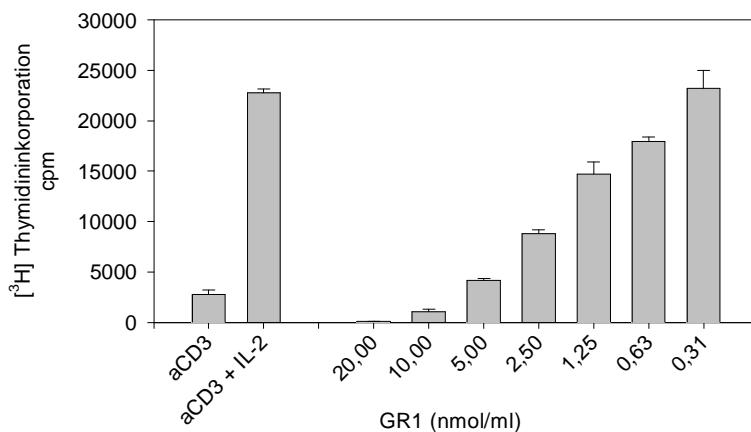


Abb. 4.15. Proliferation mit  $\alpha\text{CD3}$  und hr-IL-2. Isolierte T-Lymphozyten ( $>95\%$   $\text{CD3}^+$  Zellen) wurden mit  $10^4$  Zellen/well in mit  $\alpha\text{-CD3}$  Ak gecoateten Platten für 72h in Anwesenheit von 10 U/ml hr IL-2 inkubiert. Das ODN GR1 wurde in absteigender Konzentration zugegeben. Für die letzten 6h wurde der ( $^3\text{H}$ ) Thymidineinbau bestimmt.



Da auch die Expansion  $\alpha$ -CD3 aktivierter T-Zellen mit IL-2 durch GR1 deutlich negativ beeinflusst wurde (Abb. 4.15.), überlegte man, ob die guaninreichen ODN eventuell IL-2 inaktivieren oder dessen Bindung an seinen Rezeptor behindern würden. Die gesteigerte Tendenz an lösliche Proteine zu binden, ist für Phosphorothioatoligonukleotide bekannt und in der Literatur beschrieben (Bock et al., 1992; Kitajima et al., 1999). Ein entscheidender Faktor bei dieser Wirkung ist der polyanionische Charakter der Phosphorothioate. Auch die Bindung von humanen rekombinantem IL-2 durch Polyanionen wie Heparin, Fucoidan oder Dextransulfat ist möglich, wenngleich auch dadurch die Interaktion von IL-2 und seinem Rezeptor wohl nicht behindert wird (Najjam et al., 1998).

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob die Zugabe von IL-2 im Überschuss den antiproliferativen Effekt der ODN wieder aufheben könnte.

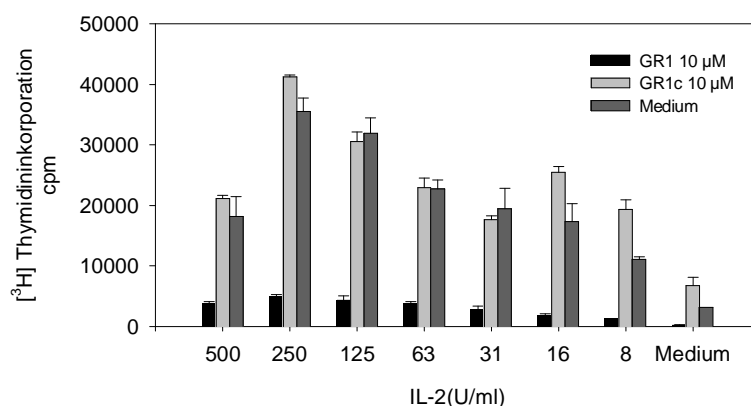


Abb. 4.16. Kompetition von GR1 mit hr-IL-2. Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3<sup>+</sup> Zellen) wurden mit  $10^4$  Zellen/well in mit  $\alpha$ -CD3 Ak gecoateten Platten für 72h mit absteigenden Konzentrationen von hr IL-2 inkubiert. Die ODN GR1 und GR1c wurden mit 10  $\mu$ M zugegeben. Für die letzten 6h wurde der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt.

Tatsächlich gelingt es, wie Abb 4.16. zeigt, auch durch exzessive Mengen an IL-2 nur einen geringen Teil der durch GR1 vollständig unterdrückten Proliferation zu rekonstituieren.

IV.2.3. Wirkung guaninreicher ODN auf die autonome Proliferation von humanen und murinen Zelllinien

Alle bisher gezeigten Ergebnisse wurden mit aus Lymphknoten oder der Milz isolierten T-Zellen durchgeführt. Deren Wachstum ist dann durch entsprechende Stimulation und Wachstumsfaktoren angeregt und aufrecht erhalten worden. Um eine eventuelle allgemeine zytotoxische Wirkung der guaninreichen ODN zu erfassen, wurde deren Einfluss auf die autonome Proliferation von Tumorzelllinien unterschiedlicher Herkunft analysiert.

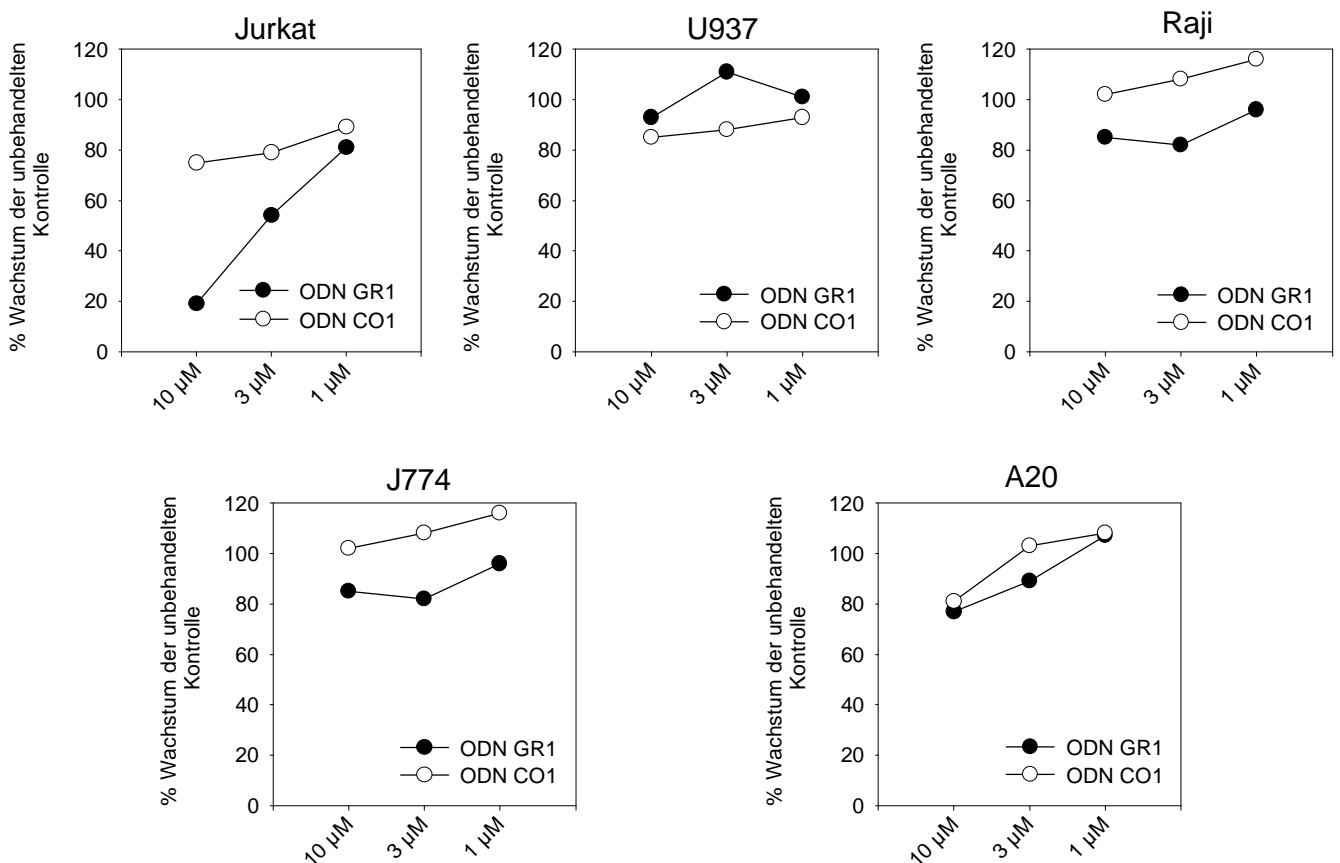


Abb.4.17. Wirkung von GR1 auf Zelllinien. Die Zellen wurden mit je 10<sup>4</sup> Zellen/well in 96 well Kulturplatten angesetzt. Murine Zelllinien wurden in Click's RPMI/5% FKS, humane Zelllinien in RPMI 1640/5% FKS für 48h inkubiert. GR1 wurde in absteigender Konzentration zugesetzt. Für die letzten 6h wurde der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt.

Interessanterweise zeigte GR1 auch bei der humanen Jurkat T-Zelllinie einen ausgeprägten dosisabhängigen Effekt auf das Zellwachstum. Die anderen

hier untersuchten Zellreihen, welche sich von Makrophagen oder B-Lymphozyten ableiten, blieben in ihrem Wachstum weitgehend unbeeinflusst. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die antiproliferative Wirkung der guaninreichen ODN nicht auf T-Zelllinien beschränkt war. Auch die adhärent wachsende Hela Zelllinie, welche von epitheliale Gewebe abstammt, wurde deutlich in ihrem Wachstum gehemmt. Auffallend war auch, dass offensichtlich die Adhärenz der Hela-Zellen durch GR1 sehr stark beeinträchtigt wurde (Daten nicht gezeigt).

### IV.2.4. Weiterführende Untersuchungen zur Wirkungsweise von GR1

Um die Wirkungsweise von GR1 genauer zu beschreiben, wurden verschiedene Untersuchungen angesetzt. R.C. Tam, von dessen Arbeitsgruppe GR1 1997 entworfen wurde, stellte es als Triple Helix bildendes ODN vor, welches an den CD 28 Promotorbereich binden und so über eine Verminderung der CD28 Expression eine verminderte Immunantwort der T - Zellen bewirken sollte (Tam et al., 1997). Es war also naheliegend, die CD28 Expression und andere aktivierungsabhängige Oberflächenmarker am Durchflusszytometer zu untersuchen.

#### IV.2.4.a. aktivierungsabhängige Oberflächenmarker unter dem Einfluss von GR1

Wie Abb.4.18. zeigt, gelingt durch GR1 tatsächlich eine Reduktion der aktivierungsabhängigen Hochregulation der CD28 Expression.

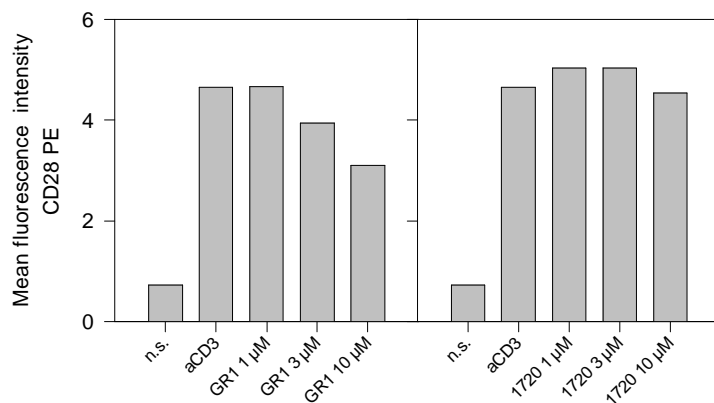


Abb. 4.18. CD28 Expression unter Wirkung von GR1. Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3<sup>+</sup> Zellen) wurden mit 10<sup>4</sup> Zellen/well in mit  $\alpha$ -CD3 Ak gecoateten Platten und 200 ng/ml PMA für 24h inkubiert. Die ODN GR1 oder 1720 wurden in aufsteigender Konzentration zugegeben. Zur Darstellung wurden jeweils 10<sup>4</sup> Ereignisse miteinbezogen.

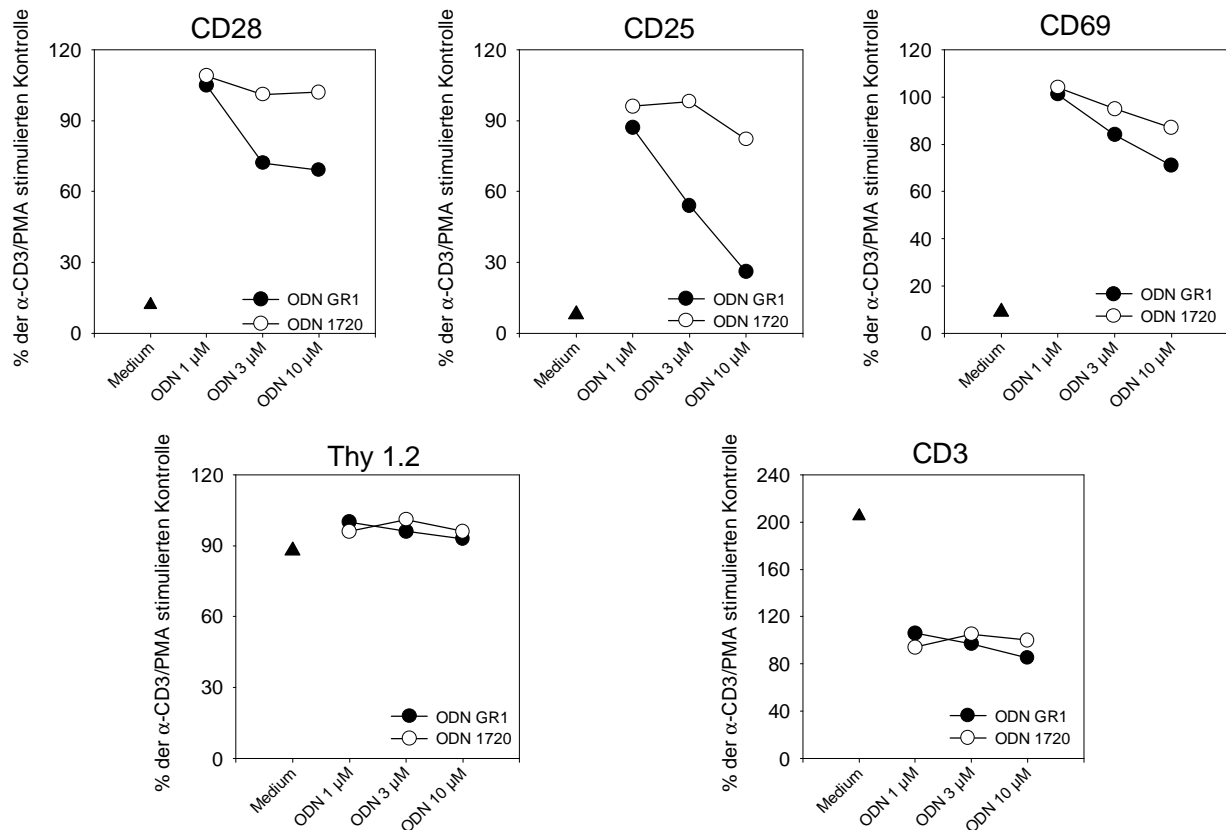


Abb. 4.19. Expression verschiedener Oberflächenmarker unter Wirkung von GR1. Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3<sup>+</sup> Zellen) wurden mit 10<sup>4</sup> Zellen/well in mit  $\alpha$ -CD3 Ak gecoateten Platten und 200 ng/ml PMA für 24h, bzw. 6h für die CD69 und CD3 Färbungen inkubiert. Die ODN GR1 oder 1720 wurden in aufsteigender Konzentration zugegeben. Zur Darstellung wurden jeweils 10<sup>4</sup> Ereignisse miteinbezogen.

Die weiteren Untersuchungen zeigten, dass ausser CD28 noch weitere aktivierungsabhängige T-Zellmarker vermindert exprimiert werden (Abb 4.19.). Neben der eher mässig ausgeprägten CD28 Reduktion kommt es ausserdem zu einer deutlichen Verminderung von CD25 und geringer von CD69. Beide sind ebenfalls aktivierungsabhängige Oberflächenantigene.

Das CD3 Oberflächenantigen wird nach Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 und PMA deutlich vermindert exprimiert. Der Grund dafür ist vermutlich die Internalisierung des TZR Komplexes von der Oberfläche der T-Zellen nach der Quervernetzung der CD3 Moleküle durch den Antikörper (Valitutti et al., 1997). Dieser Prozess scheint durch die ODN GR1 und 1720 jedoch nicht beeinflusst zu werden.

Dies gilt auch für Thy 1.2, dessen Expression sich jedoch generell nicht aktivierungsabhängig verändert.

IV.2.4.b. Wirkung von GR1 auf T – Zellen der CD28 -/- Maus

Ziel dieses Experiments ist es, zu überprüfen, ob die inhibitorische Wirkung des ODN GR1 auf T – Lymphozyten an die Expression von CD28 gebunden ist. Also wurde die Wirkung von GR1 auf T – Zellen einer normalen C57/B6 Maus mit denen einer CD28 Knockout Maus verglichen.

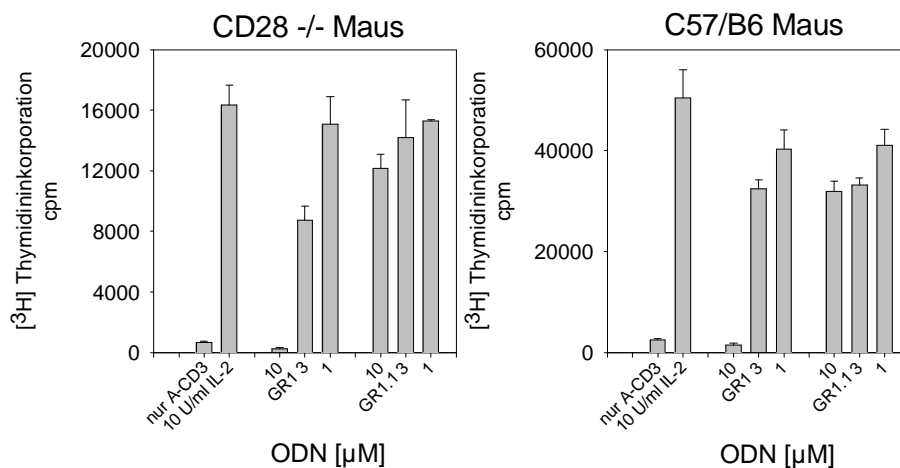


Abb.4.20. Vergleich der Wirkung von GR1 auf C57/B6 mit CD28 -/-. Je 10<sup>4</sup>/well angereicherte T – Lymphozyten wurden mit immobilisierten α-CD3 AK und 10 U/ml hrIL-2 stimuliert und mit verschiedenen Konzentrationen der ODNs für 72h inkubiert. Für die letzten 6h wurde der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt.

Es zeigte sich, dass GR1 imstande ist, das Wachstum von T - Zellen einer CD28 -/- Maus ebenso stark zu unterdrücken, wie bei einer normalen C57/B6 Maus. Eine direkte Wirkung von GR1 auf den CD28 Rezeptor kann somit ausgeschlossen werden, ein Angreifen von GR1 an einem Regulations-element, das weiter distal im CD28 Signalweg liegt, ist jedoch vorstellbar (Tam et al., 1999).

IV.2.4.c. Einfluss von GR1 auf den  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom nach TZR Stimulation

Neben der Stimulation in einer allogenen Reaktion oder mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und/oder CD28, besteht auch die Möglichkeit, T-Zellen rein pharmakologisch zu stimulieren. Zum Beispiel mit der Kombination von PMA und einem Calciumionophor, wie Ionomycin. Diese Kombination von Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern und Aktivierung der Protein Kinase C führt unter Umgehung des proximalen TZR Signalwegs zur Aktivierung und Proliferation von T-Zellen.

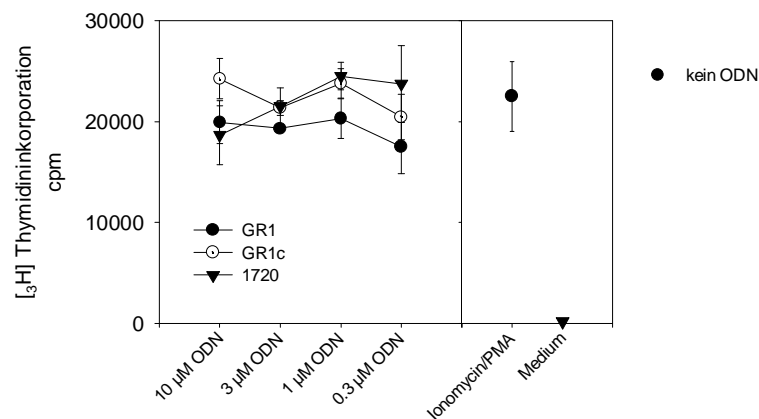


Abb. 4.21. Proliferation von T-Lymphozyten mit Stimulation von PMA und Ionomycin. Isolierte T-Lymphozyten (>95% CD3<sup>+</sup> Zellen) wurden mit  $10^4$  Zellen/well mit 200 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin für 48h inkubiert. ODNs wurden in absteigender Konzentration zugegeben. Für die letzten 6h wurde der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt.

Unter den in Abb. 4.21. gegebenen Stimulationsbedingungen zeigte das ODN GR1 kaum inhibitorische Wirkung auf das Wachstum der T-Zellen. Dies war sehr überraschend, zeigten doch alle übrigen in vitro Assays immer eine ausgesprochene Empfindlichkeit gegenüber den wachstumshemmenden Effekten der guaninreichen ODN. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass GR1 in den proximalen TZR Signalweg eingreifen könnte. Um dem nachzugehen, wurde der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in murine T-Zellen nach Stimulation mit  $\alpha$ -CD3/  $\alpha$ -CD28 untersucht.

## Eigene Ergebnisse

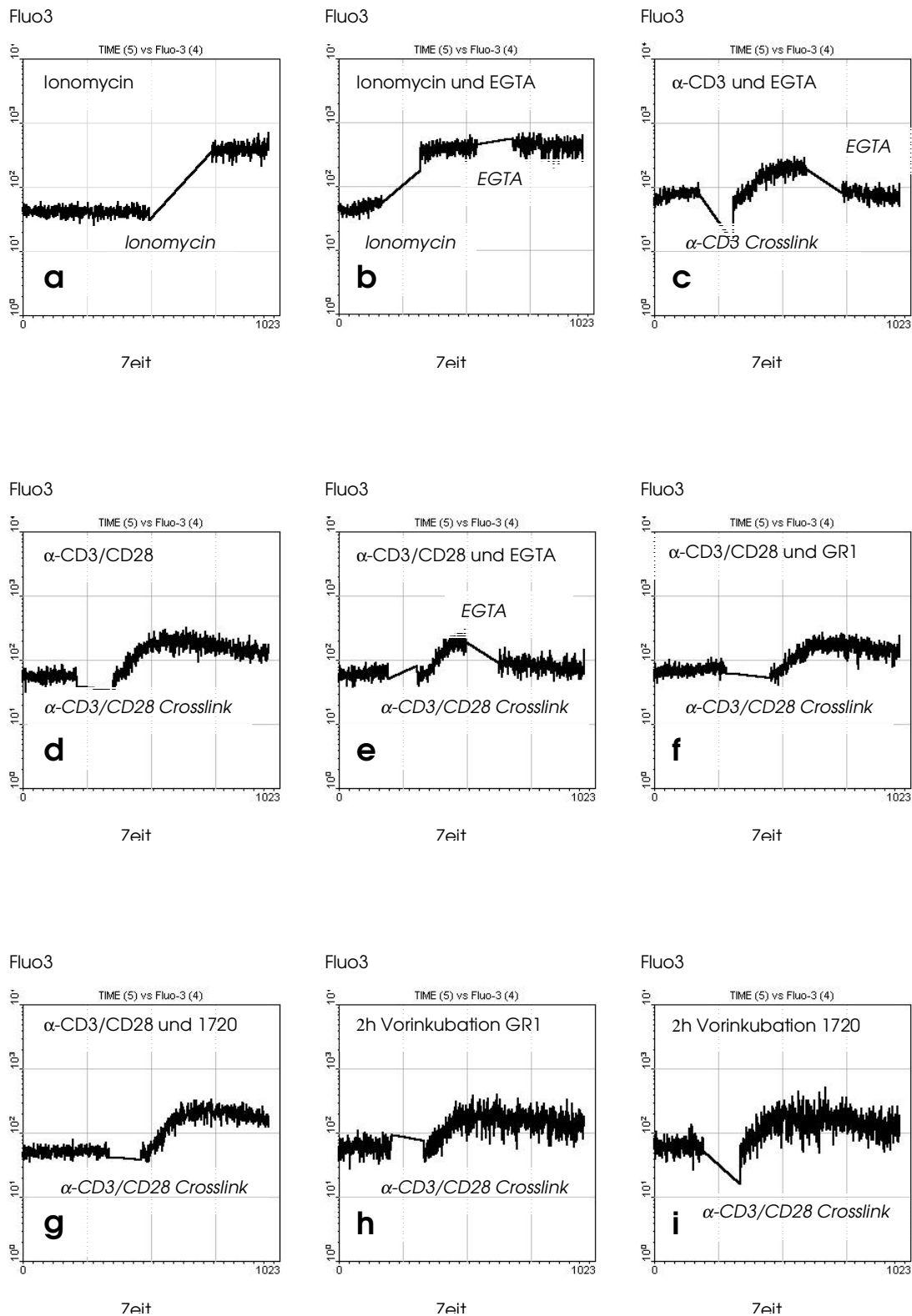


Abb. 4.22. a-i Einfluss von GR1 auf den  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom muriner T-Zellen.  $10^6$  isolierte T-Lymphozyten wurden für 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit  $1\ \mu\text{g}$  Fluo-3 AM in 1 ml PBS/2% FKS inkubiert, anschliessend zweimal mit PBS/2% FKS gewaschen. Diesem "loading" der Zellen mit dem Farbstoff folgte dann bei den Proben von 4.22.c-i. die Beladung mit Ak gegen CD3 und/oder CD28. Dazu wurden  $10^6$  Zellen mit  $5\ \mu\text{g}$  des jeweiligen Ak in 1 ml PBS/2% FKS bei  $4^\circ\text{C}$  30 min inkubiert, anschliessend zweimal mit PBS/2% FKS gewaschen. In Abb.4.22.a/b wurde mit  $1\ \mu\text{g}$  Ionomycin stimuliert, in b, c und e der  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom jeweils mit 5 mM EGTA geblockt. Für das Crosslinking wurde der Rabbit  $\alpha$  syrian hamster Ak in  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  eingesetzt.



Der Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegels wurde mit Hilfe des Farbstoffes Fluo-3 am Durchflusszytometer bestimmt. Der Farbstoff fluoresziert bei Anregung durch Laserlicht ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ), wenn er an  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden ist. Diese Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von 4 Minuten bestimmt, während dessen die Messungen kurzzeitig unterbrochen wurden, um Reagenzien oder Antikörper für das Quervernetzen von CD3 oder CD28 zuzugeben. Die Kurven in den dargestellten Diagrammen entsprechen den berechneten Mittelwerten aller zu einem Zeitpunkt erfassten Ereignisse (berechnet mit dem Programm WinMDI Version 2.8, von Joseph Trotter). Die T-Zellen wurden unmittelbar nach Anreicherung für den Versuch herangezogen und der  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom durch verschiedene Stimuli angeregt.

Es zeigten sich ähnliche zeitliche Verläufe des  $\text{Ca}^{2+}$  Einstroms bei Stimulation mit Antikörpern gegen CD3 alleine sowie gegen CD3 und CD28 kombiniert.

(Abb.4.22 c und d) Im Vergleich zu Ionomycin, welches als  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor einen Maximalstimulus darstellt, zeigen sie jedoch einen deutlich verlangsamten Anstieg der Fluoreszenz (vgl. Abb. 4.22 a mit c und d). Ausserdem zeigt der durch Ionomycin hervorgerufene  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom sich wesentlich unempfindlicher gegenüber dem „Calciumfänger“ EGTA (vgl. Abb.4.22 a mit c und e).

Der Einfluss des ODN GR1 auf den  $\text{Ca}^{2+}$  Einstroms wurde in den verschiedenen Stimulationsmodellen geprüft. Dargestellt sind in Abb.4.22. e-i. die Ergebnisse bei Stimulation der T – Zellen mit  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 bei gleichzeitiger Zugabe des ODNs oder zweistündiger Vorinkubation. Es ist im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne ODN keine Verzögerung oder gar ein Ausbleiben des  $\text{Ca}^{2+}$  Einstroms zu verzeichnen. Auch induzieren die ODN selbst keinen  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom (nicht gezeigte Daten).

#### IV.2.4.d. Nachweis einer möglichen Apoptoseinduktion durch guaninreiche ODN

Im Rahmen der Untersuchung der aktivierungsabhängigen Oberflächenmarker am Durchflusszytometer trat bei hohen Konzentrationen des ODN GR1 regelmässig eine kleine, stark granulierte Zellpopulation auf.

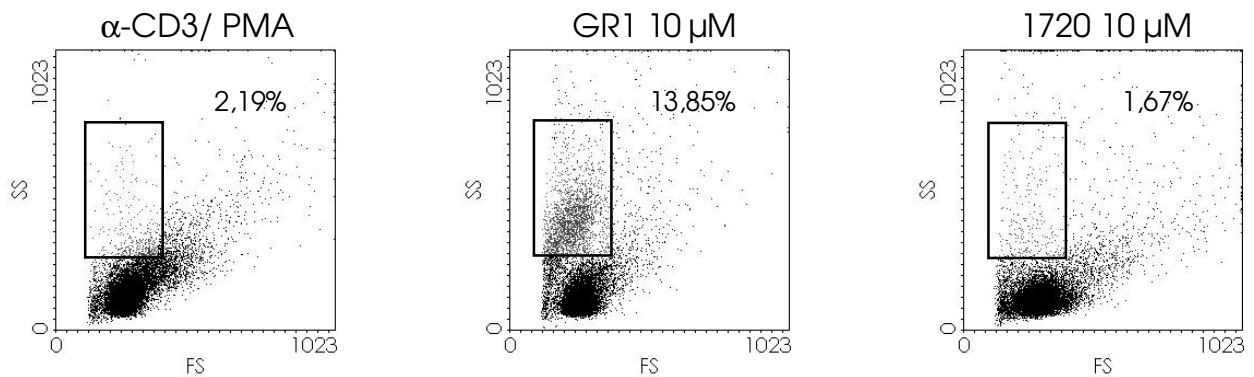


Abb.4.23. aktivierte T – Zellen im F/S scatter plot. Je 15000, mit  $\alpha$ -CD3 und PMA aktivierte T – Zellen wurden nach 20h am Durchflusszytometer untersucht.

Im F/S scatter plot werden Zellgranularität (Y-Achse) und Zellgrösse (X-Achse) gegeneinander aufgetragen. Die auffällige Zellpopulation ist im Diagramm hervorgehoben und die Prozentzahlen der in diesem Areal befindlichen Zellen sind angegeben.

Da apoptotische Zellen sich im F/S scatter plot so darstellen können, führte diese Beobachtung zu weiteren Untersuchungen.

Für den Nachweis apoptotischer Zellen steht eine Vielzahl experimenteller Ansätze zur Wahl. Zunächst sollte der DNA Gehalt der Zellen mittels einer Propidiumjodidfärbung dargestellt werden. Propidiumjodid interkaliert in die DNA Stränge und emittiert nach Anregung Licht, das bei 480 nm Wellenlänge gemessen werden kann. Die Fluoreszenzintensität der mit Propidiumjodid gefärbten Zellen ist proportional zu deren DNA Gehalt. So lässt sich zu einem die Progression von Zellen durch den Zellzyklus und den damit verbundenen Anstieg des DNA-Gehalts von diploid auf tetraploid mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmen. Bei der Apoptose hingegen treten durch die

Degradation der DNA Zellen mit einem hypodiploiden DNA Gehalt auf, welche mit dieser Methode auch sehr gut darstellbar sind.

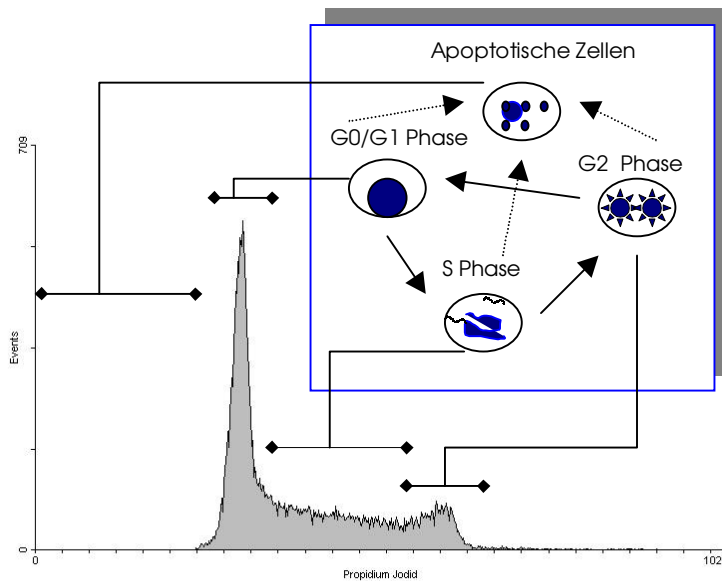


Abb.4.24. Darstellung der Phasen des Zellzyklus und apoptotischer Zellen durch Färbung mit Propidiumjodid.

In Abb.4.24. ist erklärt, wie die bei der Zellzyklusanalyse Ergebnisse zu interpretieren sind. Die apoptotischen Zellen würden sich aufgrund ihres hypodiploiden DNA Gehalts in den Diagrammen links darstellen.

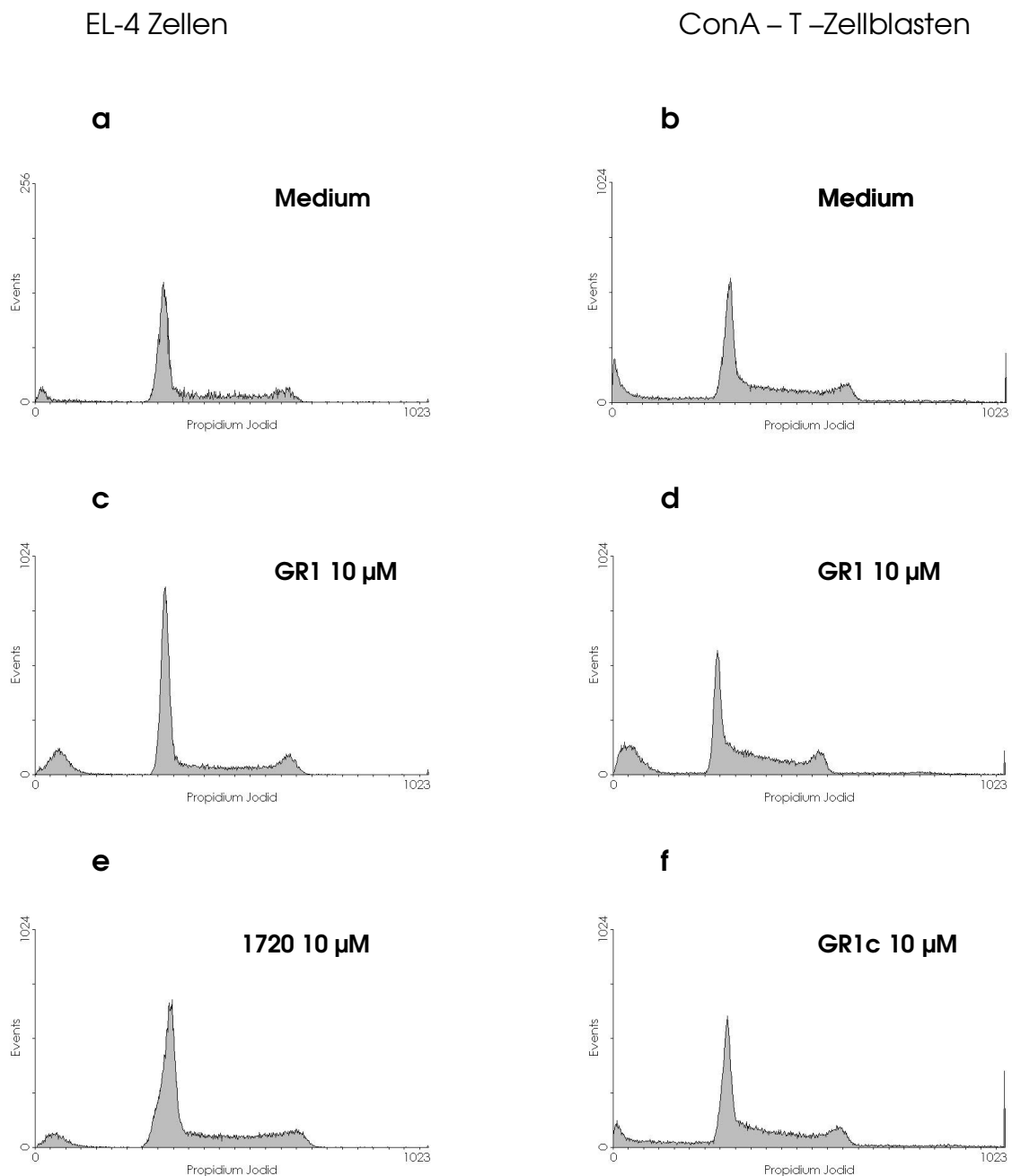


Abb.4.25.a-f. Zellzyklusanalyse von EL-4 Zellen und ConA Blasten. Linke Spalte:  $10^5$  EL-4 Zellen/Well wurden mit ODN angesetzt und nach 24h zur Zellzyklusanalyse herangezogen. Rechte Spalte: ConA Blasten wurden 24h mit ODN inkubiert, dann erfolgte die Zellzyklusanalyse. Zur Zellzyklusanalyse wurden jeweils 1-2 x  $10^6$  Zellen verwendet und am Durchflussszytometer jeweils 20000 bzw. 50000 Ereignisse ausgewertet.

Auch in der Zellzyklusanalyse von mit GR1 behandelten Zellen liess sich eine kleine Population von Zellen mit hypodiploiden DNA Gehalt nachweisen, welche der ursprünglich beobachteten (vgl. Abb.4.23) entsprechen dürfte (siehe Abb.4.25.c. und d).

Jedoch war der Anteil apoptotischer Zellen unter der Einwirkung von GR1 weitaus geringer als unter Einwirkung von  $\gamma$  - Strahlung oder Etoposid, wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

	<i>ConA Blasten</i>	<i><math>\alpha</math>-CD3</i>	<i><math>\alpha</math>-CD3+PMA</i>
<b>Kontrolle</b>	10.6 %	12.6 %	5.8 %
<b>GR1 10 <math>\mu</math>M</b>	19.6 %	11.0 %	10.2 %
<b>GR1 1 <math>\mu</math>M</b>	16.6 %	8.4 %	6.6 %
<b>GR1c 10 <math>\mu</math>M</b>	12.4 %	n. b.	6.1 %
<b>GR1 c 1 <math>\mu</math>M</b>	11 %	n. b.	4.8 %
<b><math>\gamma</math> - St. 2000 rad</b>	<b>39 %</b>	<b>74.1 %</b>	<b>59.1 %</b>

Tabelle T11: Zellzyklusanalyse von ConA-Blasten,  $\alpha$ -CD3 stimulierten und  $\alpha$ -CD3 plus PMA stimulierten T Zellen. Linke Spalte: ConA-Blasten wurden 24h mit ODN inkubiert, dann erfolgte die Zellzyklusanalyse. Mittlere Spalte:  $10^5$  T Zellen/Well wurden mit ODN in  $\alpha$ -CD3 gecoateten Platten angesetzt und nach 24h zur Zellzyklusanalyse herangezogen. Rechte Spalte:  $10^5$  T Zellen/Well wurden mit ODN in  $\alpha$ -CD3 gecoateten Platten plus 200 ng/ml PMA angesetzt und nach 24h zur Zellzyklusanalyse herangezogen. Zur Zellzyklusanalyse wurden jeweils 1-2 x  $10^6$  Zellen verwendet und am Durchflusszytometer jeweils 50000 Ereignisse ausgewertet.

Ein weiterer Nachweis apoptotischer Zellen wurde mit einem Fertigkit der Firma Boehringer-Ingelheim geführt und erbrachte vergleichbare Ergebnisse.

Eine massive direkte Apoptoseinduktion durch guaninreiche ODN lässt sich also ausschliessen. Es ist jedoch zu erwägen, dass T – Zellen unter dem Einfluss guaninreicher ODN für Wachstum und weiteres Überleben nicht ausreichend aktiviert werden können und deswegen nach einer gewissen Zeit der Prozess der Apoptose eingeleitet wird. Die beobachtete verminderte Expression von Aktivierungsmarkern unterstützt diese Hypothese.

### IV.3. Wirkungen von GR1 auf T – Zellantworten in vivo

Nachdem in verschiedenen in vitro Assays gezeigt wurde, dass das ODN GR1 die Aktivierung und das Wachstum von T - Zellen in Abhängigkeit der Stimulationsart und der verwendeten ODN Konzentration sowohl steigern als auch mindern kann, sollten nun die Effekte am Mausmodell in vivo untersucht werden. Zunächst wurden Mäuse mit dem ODN GR1 ohne zusätzlichen Stimulus behandelt. Die mesenterialen LK, die Milz und bei einigen Ansätzen der Thymus wurden entnommen und untersucht. Eine Vermehrung der Milzzellen, wie sie anderweitig im Zusammenhang mit Phosphorothioat-oligonukleotiden beschrieben ist (Monteith et al., 1997), wurde nicht beobachtet, auch die Zellzahlen im LK und dem Thymus waren normal. Am Durchflusszytometer wurden verschiedene Oberflächenmarker auf T – Lymphozyten analysiert, innerhalb verschiedenster Beobachtungszeiträume nach Gabe des ODN liessen sich jedoch keine Veränderungen nachweisen. Schliesslich wurden die Zellen mit GR1 behandelte Mäuse in in vitro Assays eingesetzt.

#### IV.3.1. MLR mit Zellen von GR1 behandelten Mäusen

In diesem experimentellen Ansatz wurden jeweils 2 Mäuse des Stamms C57/Bl6 pro Gruppe entweder mit 10 nmol GR1 oder 200 µl PBS intraperitoneal behandelt. Nach 24 h wurden die Milzen der Tiere entnommen und in separaten Ansätzen wurden die Milzzellen der mit GR1 behandelten Tiere jeweils als Stimulator oder Responderzellen, zusammen mit Milzzellen einer Balb/c Maus eingesetzt. Diese Gruppen wurden mit den unbehandelten verglichen.

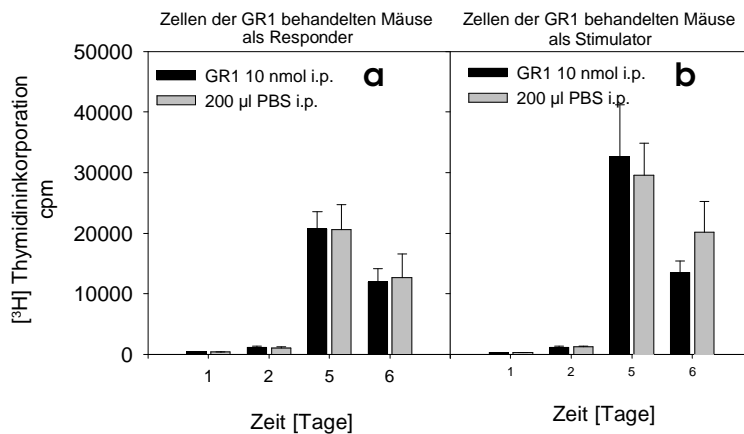


Abb.4.26. Mixed lymphocyte reaction. a.)Milzzellen einer mit 10 nmol GR1 i.p. behandelten C57/Bl 6 Maus (H-2K<sup>b</sup>) wurden mit 10<sup>5</sup> Zellen/well zusammen mit 2 x10<sup>5</sup> Milzzellen/well einer Balb/c Maus (H-2K<sup>d</sup>) inkubiert. Die Milzzellen der Balb/c Maus wurden vor der Zugabe zur Kultur mit 1500 rad bestrahlt. b.)Milzzellen einer mit 10 nmol GR1 i.p. behandelten C57/Bl 6 Maus (H-2K<sup>b</sup>) wurden mit 2 x10<sup>5</sup> Zellen/well zusammen mit 10<sup>5</sup> Milzzellen/well einer Balb/c Maus (H-2K<sup>d</sup>) inkubiert. Die Milzzellen der C57/Bl 6 Maus wurden vor der Zugabe zur Kultur mit 1500 rad bestrahlt. Die Proliferation wurde über einen Zeitraum von sechs Tagen erfasst , indem für die letzten 6h der (<sup>3</sup>H) Thymidineinbau bestimmt wurde.

Die Milzzellen der mit GR1 behandelten Mäuse zeigten sowohl als Stimulator als auch als Responderzellen keinen Unterschied zur Kontrollgruppe in der MLR.

Ähnlich wie in den in vitro Assays schien GR1 alleine keine Reaktion bewirken zu können. Also galt es nun GR1 in Verbindung mit einem entsprechenden antigenen Stimulus einzusetzen.

#### IV.3.2. Einfluss von GR1 auf die in vivo Stimulation mit SEB

SEB, das Staphylokokken Enterotoxin B, ist als sogenanntes Superantigen in der Lage eine grosse Anzahl von T - Zellen zu aktivieren, denn es bindet nicht an der Antigenbindungsstelle, sondern an der V $\beta$ 8 Domäne des TZR. Der Vorteil gegenüber einer Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 AK ist, dass man durch die V $\beta$ 8 Spezifität der SEB Stimulation eine aktivierte Gruppe von T - Zellen gegenüber einer ruhenden klar abgrenzen kann und so zwei Populationen direkt miteinander vergleichen kann. SEB und GR1 wurden intraperitoneal angewandt, nach 18h wurden die mesenterialen LK entnommen und am Durchflusszytometer untersucht.

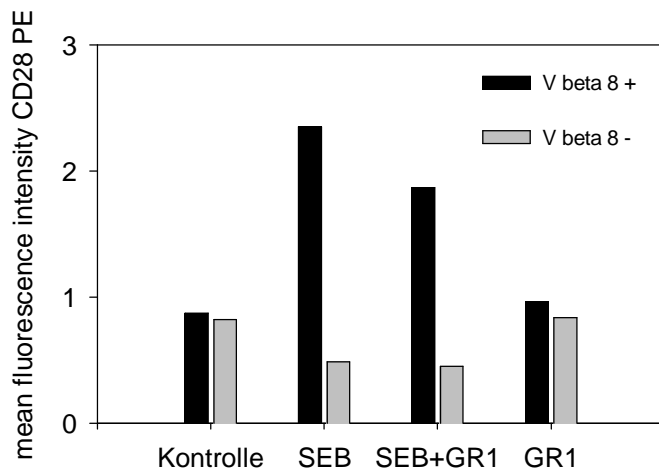


Abb.27. CD28 Expression auf V $\beta$ 8+ T – Zellen. Balb/c Mäuse wurden mit 10  $\mu$ g SEB, 10  $\mu$ g SEB und 10 nmol GR1, 10 nmol GR1 oder PBS intraperitoneal gespritzt. Nach 18h wurden die mesenterialen LK entnommen und die Zellen jeweils mit CD28 PE gegen V $\beta$ 8 Fitc gefärbt.

GR1 bewirkt eine nur geringe Reduktion der CD28 Expression auf den V $\beta$ 8+ Zellen. Um feststellen zu können, ob dies einen Einfluss auf die Funktion der T - Zellen hat, wurde das folgende Experiment durchgeführt.

#### IV.3.3. Einfluss von GR1 auf CD8+ T-Zellen Ovalbumin immunisierter Mäuse

C57/Bl 6 Mäuse wurden an Tag 1 mit dem ODN 1668 behandelt, an Tag 3 mit Ovalbumin immunisiert und nach weiteren 4 Tagen wurden die poplitealen und inguinalen Lymphknoten entnommen und diese Zellen wurden in einem  $^{51}\text{Cr}$  Zytotoxizitätstest auf ihre Fähigkeit untersucht, mit einem Ova-Peptid beladene Zielzellen zu lysieren. Das CpG ODN 1668 dient in diesem Ansatz als Adjuvans. Da es diese Eigenschaft besitzt und diese auch bei Vorbehandlung mit 1668 wirksam ist, wurde bereits beschrieben (Lipford et al., 1997). Diese Vorbehandlung erschien sinnvoll, da bei gleichzeitiger Anwendung beider ODN eine gegenseitige Verdrängung bei der Aufnahme in die Zellen denkbar gewesen wäre.



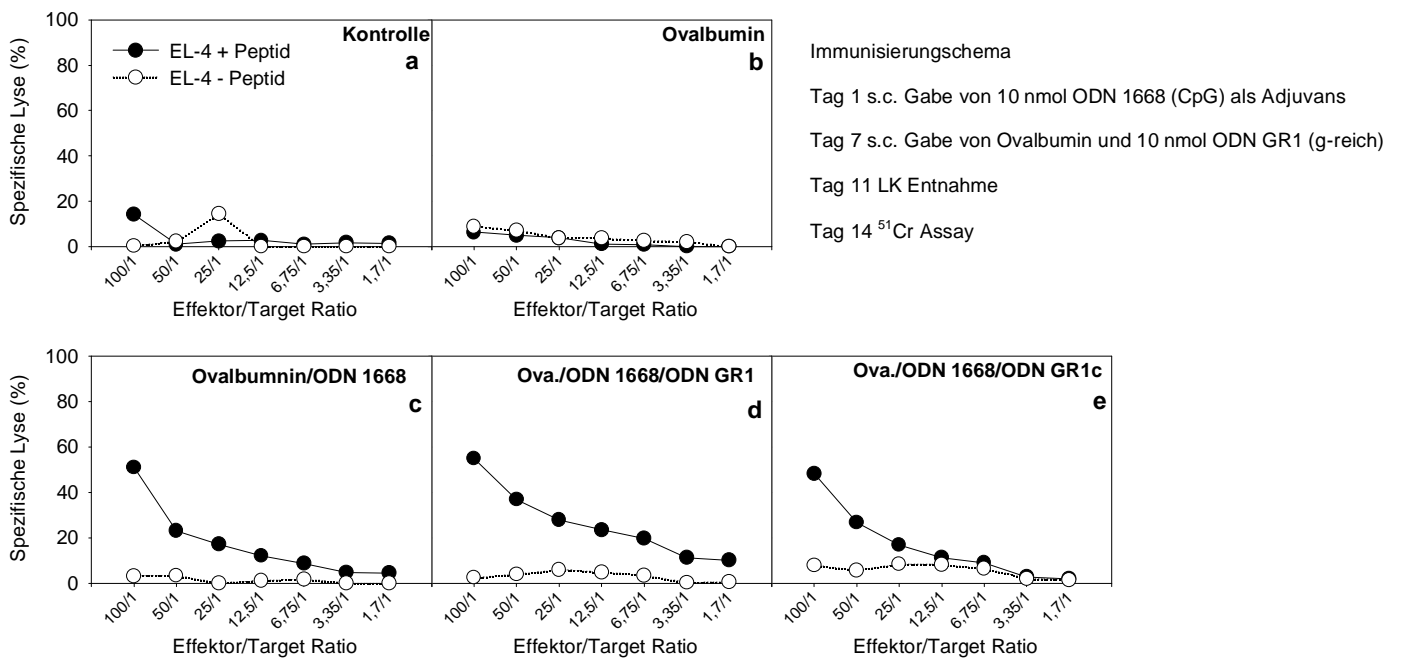


Abb.4.28.a-e.  $^{51}\text{Cr}$  Zytotoxizitätstest. EL-4 und EG-7 Zielzellen wurden mit  $14 \text{ Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Lösung 90 min bei  $37^\circ\text{C}$  gelabelt und anschliessend gewaschen. Effektorzellen in verschiedenen Verdünnungen wurden mit  $1 \times 10^3$  Zielzellen pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden 4h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Menge an freigesetztem Chrom wurde in counts per minute (cpm) an einem  $\gamma$ -Counter gemessen. Die Ergebnisse werden in % spezifische Lyse ausgedrückt.

Die Zellen der mit 1668 als Adjuvans behandelten Mäusen zeigen eine deutliche lytische Aktivität gegenüber den mit dem Ova-Peptid beladenen Zielzellen (Abb.4.28.c.). Ohne Adjuvans lässt sich keine Lyse nachweisen (Abb. 4.28.b.). Die Behandlung mit GR1 oder dem Kontrolloligonukleotid zeigte keine signifikante Änderung (Abb.4.28.d. und e.).



## V. Diskussion

### V.1. Guaninreiche Oligonukleotide kostimulieren murine T-Zellen

Die Aktivierung von T-Lymphozyten ist ein genau regulierter Prozess und eine effektive T-Zellantwort bedeutet die Integration verschiedener Signale.

Eine naive T-Zelle benötigt zu ihrer vollständigen Aktivierung 2 Signale (Bretscher und Cohn, 1970; Lafferty und Woolnough, 1977; Schwartz, 1992). Signal 1 wird durch den T-Zellrezeptor verarbeitet, das Signal 2 erhält der T-Lymphozyt über kostimulatorische Rezeptoren. Ein kostimulatorisches Oberflächenmolekül mit hervorgehobener Bedeutung für die T-Zellaktivierung ist CD28 (June et al., 1994). Dabei ist diese Kostimulation nicht einfach als Verstärkung des Signals über den TZR zu verstehen, vielmehr versetzt das Signal 2 über CD28 T-Lymphozyten überhaupt erst in die Lage dauerhaft zu proliferieren und zu überleben und damit Effektorfunktionen im Rahmen der Immunantwort wahrzunehmen (Mueller et al., 1996; Radvanyi et al., 1996; Vella et al., 1997).

Die hier geschilderte kostimulatorische Aktivität guaninreicher ODN ist der von CD28 funktionell sehr ähnlich.

#### V.1.1. Ein TZR Stimulus konditioniert für die Wirkung der Oligonukleotide

Setzt man angereicherte T-Zellen mit guaninreichen ODN ohne einen entsprechenden TZR Stimulus in Kultur an, so lässt sich weder Proliferation, noch CD25 Expression oder IL-2 Produktion feststellen. Wird durch  $\alpha$ -CD28 Ak zusätzlich ein Signal 2 gegeben, ergibt sich das gleiche Bild.

Erst die Gabe eines TZR Stimulus durch  $\alpha$ -CD3 Ak sensibilisiert murine T-Zellen für die Effekte guaninreicher ODN. Ähnliche Beobachtungen wurden mit B-Zellen gemacht, welche nach Quervernetzung ihrer Oberflächen - Immunglobuline eine deutlich gesteigerte Reaktivität auf CpG-ODN zeigten (Krieg et al., 1995; Yi et al., 1996) .

Interessanterweise nehmen ruhende lymphoide Zellen ODN nur mässig auf, nach Aktivierung jedoch steigert sich die Aufnahme deutlich (Krieg et al.,

1991; Zhao et al., 1996). Auf die Frage, ob eine Aufnahme guaninreicher ODN für deren Wirkung notwendig ist, wird noch eingegangen.

Die Abhängigkeit der ODN Aktivität von einem TZR Signal wird auch deutlich, wenn dieses durch Cyclosporin A pharmakologisch blockiert wird. Bereits relativ niedrige Dosen dieses in der Klinik angewandten Immunsuppressivums unterdrücken die ODN induzierte Proliferation.

### V.1.2. Die ODN vermittelte Kostimulation muriner T-Zellen ist ein CpG-unabhängiger Effekt

Erste Untersuchungen zur ODN vermittelten Kostimulation gingen von CpG ODN aus, schlossen aber auch Hybrid-ODN mit ein, welche neben einem CpG Motiv guaninreiche Sequenzelemente enthielten (Bendigs et al., 1999). Bereits hier zeigte sich, dass diese Hybrid-ODN weitaus effektiver in der Kostimulation waren als CpG-ODN. Methylierung und Inversion der CpG Motive in den Hybrid-ODN führen zu einem völligen Verlust ihrer Wirksamkeit auf Makrophagen und B-Zellen. Die T-Zellkostimulation wird durch diese Veränderungen nicht beeinflusst (Bendigs et al. 1999; Wagner, 2000). Die ursprünglich registrierte kostimulatorische Aktivität reiner CpG ODN, wie z.B. ODN 1668, ist vermutlich auf „kontaminierende“ Makrophagenpopulationen in den in vitro Ansätzen zurückzuführen. Diese würden durch CpG ODN dazu angeregt, die Oberflächenrezeptoren B7.1 und B 7.2 hochzuregulieren und Zytokine wie IL-12 und TNF $\alpha$  zu sezernieren. Das bei reinen CpG ODN beobachtete Phänomen der Kostimulation ist somit ein makrophagen-abhängiges mittelbares Phänomen. In weiteren Untersuchungen, in denen eine weitaus höhere Anreicherung der T-Zellen gelang, zeigten CpG ODN keinerlei Wirkung mehr, wohl aber Hybrid-ODN welche auch guaninreiche Elemente enthielten (Lipford et al., 2000).

Das ODN GR1 ist ein 18mer, welcher je zwei Blöcke von je 5 bzw. 4 Guaninbasen enthält. Es ist in der Lage murine  $\alpha$ -CD3 getriggerte T-Zellen in einer Dosis von 0,3 bis 3  $\mu$ M effektiv kostimulieren und sie zu einem IL-2 abhängigen Wachstum anzuregen. Höhere ODN Dosen führen zu keiner

weiteren Steigerung, sondern ab ca. 5  $\mu\text{M}$  kommt es zu einer deutlichen Abnahme und bei ca. 10  $\mu\text{M}$  zum völligen Erlöschen der Proliferation.

Ausgehend von GR1 wurden zahlreiche Sequenzvarianten des Ursprungsoligomers entworfen und auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Es zeigte sich, dass wenigstens ein Block von 4 Guaninbasen notwendig ist, um Kostimulation zu bewirken. Insbesondere zeigten sich jedoch solche ODN als „gute“ Kostimulatoren, welche 2 Blöcke von 3 oder mehr Guaninbasen enthielten. Eine unterschiedliche Lage der Guaninblöcke innerhalb der ODN hatte nur geringen Einfluss auf die Wirkstärke. Die Sequenzvoraussetzungen für die T-Zellkostimulation sind also insgesamt wenig restriktiv. Eine theoretisch denkbare Interaktion der guaninreichen ODN mit der DNA oder mRNA der T-Zellen ist als gemeinsamer Wirkmechanismus äusserst unwahrscheinlich. Derartige Triple-Helix oder Antisense Modelle sind sehr sequenzspezifisch und bereits eine Basenfehlpaarung kann eine Hybridisierung zwischen dem ODN und der Zielsequenz in der DNA bzw. mRNA unmöglich machen.

#### V.1.3. ODN vermittelte T-Zellkostimulation – Ein Effekt von Quadruplex-DNA?

Eine Gemeinsamkeit jedoch verbindet die guaninreichen ODN. Es ist die Tendenz derartiger Moleküle mit sich selbst zu hybridisieren und so Dimere oder Tetramere zu bilden (Jin et al., 1992; Sen und Gilbert, 1990). Derartige höhere Strukturen finden sich auch an den Telomeren der Chromosomen (Kang et al., 1992).

Das ODN GR1 und einige seiner Derivate erfüllen die Voraussetzungen solche Tetramere oder sogenannte Quadruplex-DNA (Kerwin, 2000) zu bilden. Bei GR1 wurde diese Formation höherer Strukturen durch Auftrennung im Polyacrylamidgel nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Guaninreiche ODN zeigten als Tetramere beispielsweise eine antivirale Aktivität gegen HIV (Wyatt et al., 1994) und eine hohe Bindungsaffinität für bestimmte Serum- oder Oberflächenproteine (Bock et al., 1992; Pearson et al., 1993).

Bei einigen dieser Effekte ist wohl der polyanionische Charakter solcher Tetramere für die Bindung an Proteine verantwortlich. In den Experimenten

liessen sich die Wirkungen der Oligomere durch die Zugabe von anderen Polyanionen kompetitieren (Pearson et al., 1993; Stein et al., 1991; Wyatt et al., 1994).

Die T-Zellkostimulation durch guaninreiche ODN wird durch polyanionische Substanzen wie Heparin, Dextransulfat und Fucoidan nicht spezifisch gehemmt. Lediglich bei sehr hohen Dosen kommt es zu einer deutlichen Abnahme des Zellwachstums, welches aber auch die Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 und IL-2 betrifft. Ebenso waren diese polyanionischen Substanzen selbst nicht in der Lage  $\alpha$ -CD3 getriggerte T-Zellen koaktivieren.

Auch ein Denaturieren der Quadruplex DNA durch kurzzeitiges Erhitzen der Oligomere auf ca. 95°C und sofortiges Abkühlen vor dem Einsatz in der Zellkultur zeigte keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

Somit ist die Formierung von Quadruplex-DNA Oligomeren als gemeinsame strukturelle Voraussetzung für die Wirkung auf T-Zellen zwar aufgrund der Sequenzmerkmale wahrscheinlich, lässt sich aber mit den Ergebnissen der Untersuchungen nicht beweisen.

### V.1.4. Guaninreiche Oligonukleotide – Ersatz von oder Konkurrenz mit CD28?

Guaninreiche ODN haben in ihren Eigenschaften als Kostimulatoren erstaunliche Gemeinsamkeiten mit den über CD28 vermittelten Effekten auf T-Zellen.

So führt das ODN GR1 zur Sezernierung von IL-2, Expression des hochaffinen IL-2 Rezeptors und sukzessivem, IL-2 abhängigem Wachstum der T-Zellen. Diese Phänomene spiegeln kardinale Punkte der CD28 Wirkung wieder. Dabei ist allerdings anzumerken, dass mit guaninreichen ODN allenfalls 50% der Wirkstärke von  $\alpha$ -CD28 Ak als Kostimulator zu erreichen war.

Weiterhin zeigten Experimente mit CD28  $-/-$  Mäusen, dass guaninreiche ODN in der Lage sind CD28 defiziente T-Zellen im Kontext eines TZR Stimulus zu effektiver Proliferation anzuregen. Guaninreiche ODN sind also ein funktioneller Ersatz für das CD28 Signal. Ausserdem beweisen die Experimente mit den

Zellen der CD28 knockout Maus, dass die ODN vermittelte Kostimulation nicht über eine direkte Interaktion mit dem CD28 Molekül zustande kommen kann. Diese offensichtliche Unabhängigkeit von der CD28 Expression bei der Wirkung guaninreicher ODN ist gerade in Bezug auf das ODN GR1 von besonderem Interesse, da ihm ein direkter und spezifischer Einfluss in die Regulation der CD28 Expression zugesprochen wird (Tam et al., 1999; Tam et al., 1997).

#### V.1.5. Üben Guaninreiche ODN ihre Wirkung durch Bindung an die Zellmembran oder Oberflächenrezeptoren aus?

Oligonukleotide werden von Zellen durch einen sequenzunspezifischen endozytotischen Prozess aufgenommen. Zellen der lymphoiden Reihe zeigen nach Stimulation jedoch eine erhebliche Zunahme der ODN Aufnahme (Krieg et al., 1991).

Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass der Wirkort von guaninreichen ODN im Extrazellulärraum liegt. Zum einen geht der kostimulatorische Effekt nach einfachem Auswaschen der ODN verloren. Selbst wenn das ODN GR1 bis zu 12h in der Zellkultur eingesetzt wird, lässt sich nach dem Entfernen der ODN haltigen Lösung keine Proliferation mehr registrieren (eigene Daten).

Darüber hinaus sind von mehreren Autoren verschiedene guaninreiche ODN beschrieben, die an Zelloberflächenrezeptoren wie Mac-1 (Benimetskaya et al., 1997b), CD4 (Yakubov et al., 1993) oder den  $\gamma$ -IFN Rezeptor (Lee et al., 1996) binden.

Auch die kostimulatorische Wirkung guaninreicher ODN auf murine T-Zellen könnte durch Interaktion mit einem bis jetzt noch nicht bekannten Oberflächenmolekül erklärbar sein. Die Bindung des ODN GR1 an ein zelluläres Protein wurde bereits von R. Lang im Rahmen von Untersuchungen mit murinen Knochenmarkszellen nachgewiesen (Lang et al., 1999).

Richtet man sich nach der biologischen Aktivität der guaninreichen ODN, so ist es naheliegend, ihren potentiellen Rezeptor in einem Oberflächenmolekül zu suchen, welches dem CD28 Rezeptor zumindest funktionell sehr ähnlich ist.

Es gibt neben CD28 eine Reihe anderer Rezeptoren auf T-Zellen mit kostimulatorischen Eigenschaften (Liu et al., 1992; Van Seventer et al., 1990; Watts und DeBenedette, 1999).

Ein weiterer vielversprechender Erklärungsansatz des Wirkprinzips der guaninreichen ODN steht in Zusammenhang mit dem sogenannten „raft mediated signalling“ (Lipford et al., 2000). „membrane rafts“ sind mit Sphingolipiden und Cholesterin angereicherte Bereiche in der Zellmembran, in denen sich auch gehäuft Proteine mit einer Signaltransduktionsfunktion finden (Brown und London, 2000; Simons und Ikonen, 1997). Der Formierung solcher abgegrenzter Domänen wird auch im Rahmen der T-Zellaktivierung und Kostimulation eine Bedeutung zugesprochen (Patel et al., 2001; Yashiro-Ohtani et al., 2000). Guaninreiche ODN könnten z.B. GPI (glykosyl-phosphatidylinositol) verankerte Proteine in diesen „membrane rafts“ quervernetzen und so zu einer Signaltransduktion führen (Lipford et al., 2000).

### V.2. Inhibition von T-Zellaktivierung und -wachstum durch guaninreiche ODN

Im Gegensatz zu seiner gerade beschriebenen wachstumsfördernden Wirkung auf  $\alpha$ -CD3 stimulierte T-Zellen zeigt das gleiche ODN GR1 in höheren Dosierungen einen inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum unter verschiedensten Stimulationsbedingungen.

Auch die Wirkung von CpG-DNA kann durch guaninreiche ODN in vitro und in vivo aufgehoben werden (Lipford et al., 2000). Dies geschieht vermutlich durch eine direkte Konkurrenz bei der Aufnahme in die Zellen (Häcker et al., 1998). Neben diesen Berichten über ungewollte, nichtspezifische Effekte zeigten Tam et al. 1997, dass durch das ODN GR1 ein spezifischer Eingriff in die Regulation der CD28 Expression möglich ist und man so T - Zellanworten in vitro und in vivo beeinflussen kann (Tam et al., 1997).

Insgesamt mahnen die zahlreichen Hinweise auf sequenzunspezifische Toxizität guaninreicher ODN zur Vorsicht bei der Interpretation von experimentellen Ergebnissen. Die Mehrzahl der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden exemplarisch mit dem ODN GR1 oder einem seiner Derivate



dargestellt, doch liessen sich gerade die inhibitorischen Effekte auf murine T-Zellen auch mit strukturell dem ODN GR1 nicht verwandten guaninreichen ODN nachvollziehen. Diese Arbeit zielt in ihrer Fragestellung auch nicht auf die Wirkung eines bestimmten Oligonukleotids, sondern dient der Darstellung einer heterogenen Gruppe von ODN, die lediglich die Präsenz von Polyguaninelementen in ihrer Sequenz gemeinsam haben.

#### V.2.1. Die wachstumshemmende Potenz guaninreicher ODN variiert abhängig von der Stimulationsart der T-Zellen

Das ODN GR1 führt in einer Dosis von 10  $\mu\text{M}$  zum völligen Stopp der ( $^3\text{H}$ ) Thymidinaufnahme von T-Zellen, welche in einer MLR Kultur oder mit  $\alpha\text{-CD3}$  Ak und Phorbol ester (PMA) stimuliert wurden.

Bei gleicher Konzentration bewirkt GR1 bei  $\alpha\text{-CD3}/\alpha\text{-CD28}$  stimulierten T-Zellen eine Reduktion der Proliferation um ca. 80%. Werden die T-Zellen jedoch rein pharmakologisch mit Ionomycin und PMA aktiviert, so lässt sich keine antiproliferative Wirkung guaninreicher ODN mehr registrieren.

Ein Eingriff guaninreicher ODN in Signalwege proximal der Eingriffsorte dieser Substanzen ist also vorstellbar. Wie die Messungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms nach Quervernetzung von CD3 zeigte, scheint dieser von GR1 nicht beeinflusst zu werden. Auch das Verschwinden und die Internalisierung des TZR/CD3 Komplexes von der Zelloberfläche, ein fundamentales Ereignis im Prozess der T-Zellaktivierung (Valitutti et al., 1997), scheint durch GR1 nicht negativ beeinflusst zu sein.

Diese Beobachtungen sprechen gegen eine Interferenz von GR1 mit dem TZR - Signalweg.

### V.2.2. Die antiproliferative Wirkung von GR1 ist unabhängig von der CD28 Expression

T-Zellantworten durch Reduktion der CD28 Expression zu beeinflussen, ist ein vielversprechender Ansatz, wenn man sich die Bedeutung von CD28 bei der Induktion und Aufrechterhaltung einer effektiven Immunreaktion vergegenwärtigt (Boussiotis et al., 1994; Tan et al., 1993).

Die Induktion von Toleranz durch Blockade des CD28 Signalwegs ist nach Tam et al. auch der Wirkmechanismus des guaninreichen ODN GR1 (Tam et al., 1997).

Die hier dargelegten Ergebnisse sprechen jedoch dafür, dass noch weitere, CD28 unabhängige Effekte zu der inhibitorischen Wirkung von GR1 beitragen. Die Expansion Concanvalin A aktivierter CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellblasten ist ein Prozess, welcher abhängig ist von exogen zugeführtem IL-2. Aber auch dieses IL-2 abhängige Wachstum wird durch GR1 gehemmt.

Des Weiteren wirkt GR1 auch depressiv auf die autonome Proliferation verschiedener humaner und muriner Tumorzelllinien. Auch dieses Wachstum ist eigentlich unabhängig von einer intakten CD28 Signalgebung.

Schliesslich sind auch CD28 -/- T-Lymphozyten durch GR1 in gleicher Weise wie die T-Zellen einer Wildtypmaus in ihrem Wachstum hemmbar.

Und es sind neben der Expression von CD28 auch die anderer, aktivierungsabhängiger Oberflächenmarker durch das ODN GR1 reduziert worden.

Stimulation des TZR in Abwesenheit oder bei Blockade kostimulatorischer Signale kann zu aktivierungsabhängiger Apoptose der T-Zellen führen (Noel et al., 1996; Radvanyi et al., 1996). Jedoch konnte für das ODN GR1 weder in Anwesenheit eines TZR Stimulus eine stark vermehrte Apoptose von primären T-Zellen nachgewiesen werden, noch zeigte sich eine ausgeprägte direkte apoptosefördernde Wirkung bei ConA aktivierten T-Zellblasten und der Thymomzelllinie EL-4.

Mit grosser Wahrscheinlichkeit übt das ODN GR1 also seine Wirkung zumindest nicht ausschliesslich über den von Tam et al. beabsichtigten Mechanismus aus.

### V.2.3. Erklärungsansätze für die antiproliferative Wirkung guaninreicher ODN

Folgende zum Teil bereits geschilderte eigene Ergebnisse erbringen Hinweise auf einen möglichen Wirkmechanismus guaninreicher ODN:

1. Einen Eingriff in den Calcineurin abhängigen Teil der TZR Signals konnte ausgeschlossen werden. 2. Eine Wirkung durch Bindung an CD28 oder Verminderung seiner Expression ist ebenso unwahrscheinlich. 3. Guaninreiche ODN bewirken auch keine vermehrte Apoptose der T-Zellen. 4. Eine Interferenz guaninreicher ODN mit IL-2 konnte nicht nachgewiesen werden. 5. Guaninreiche ODN wirken auch negativ auf die autonome Proliferation von Tumorzelllinien.

Diese zum Teil sehr unterschiedlichen Befunde lassen sich mit einem einzigen Wirkmechanismus nur schwer vereinbaren. So kann bei primären T-Zellen durch Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat und Ionomycin die antiproliferative Wirkung praktisch aufgehoben werden, was primär auf einen Eingriff in Signalwege, die proximal der Angriffsorte dieser Substanzen liegen, schließen lässt.

Eine weitere Aspekt liefert die negative Beeinflussung des Wachstums der Jurkat Tumorzelllinie. Dieses Wachstum ist autonom, also unabhängig von mitogenen Stimuli. Jedoch leitet sich diese Zelllinie von humanen T-Zellen ab und da andere Tumorzelllinien in ihrem Wachstum nicht wesentlich durch GR1 gehemmt werden, ergibt sich das Bild einer gewissen Selektivität guaninreicher ODN für T-Zellen, oder zumindest einer erhöhten Sensibilität dieses Zelltyps.

Negative Auswirkungen guaninreicher ODN auf das Zellwachstum findet man in der Literatur an vielen Stellen beschrieben (Benimetskaya et al., 1997a; Saijo et al., 1997; Yaswen et al., 1993). Wie guaninreiche ODN das Zellwachstum beeinflussen, ist jedoch bis heute ungeklärt.

Eine Reihe von Veröffentlichungen geht davon aus, dass guaninreiche ODN die Adhäsion von Zellen ungünstig beeinflussen und so das Zellwachstum inhibieren könnten (Khaled et al., 1996; Saijo et al., 1997). Auch das ODN GR1 zeigte derartige Effekte an der Hela-Zelllinie. Bei höheren ODN Konzentrationen war eine Abrundung und Ablösung dieser epithelialen, adhären

wachsenden Zelllinie zu beobachten. Diese morphologischen Veränderungen gingen einher mit einem deutlich verminderten Wachstum der Zellen (eigene Daten).

Da auch die Aktivierung von T-Zellen ein Prozess ist, bei dem die Zelladhäsion eine entscheidende Rolle spielt, läge hier ein möglicher Angriffspunkt für die Wirkung von guaninreichen ODN.

Eine weitere Hypothese zur Wirkungsweise guaninreicher ODN stützt sich auf deren strukturelle Ähnlichkeit zu DNA Strukturen im Bereich der Telomere. Die Telomeren bestehen aus guaninreichen repetitiven Sequenzen (TTA GGG), welche durch das Enzym Telomerase an die Enden der Chromosomen angefügt werden. Die Länge der Telomeren und die Aktivität der Telomerase spielen eine kritische Rolle für die replikative Potenz und Lebensdauer von eukaryoten Zellen, was sich in Ihrer Bedeutung bei der Kanzerogenese zeigt (Artandi und DePinho, 2000).

Die Telomeraseaktivität wird in murinen T-Lymphozyten nach Aktivierung durch verschiedene Stimuli gesteigert (Ogoshi et al., 1997). In Form einer molekularen Mimikry könnten guaninreiche ODN wie GR1 mit dem Enzym Telomerase interagieren und auf diese Weise ihre antiproliferative Wirkung ausüben (Mata et al., 1997; Page et al., 1999). Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass durch die Anreicherung einzelsträngiger guanreicher DNA Bruchstücke ein p53 abhängiger Arrest im Zellzyklus induziert wird (Saretzki et al., 1999).

Des weiteren sind auch antiproliferative Wirkungen guaninreicher ODN durch Bindung an Nucleolin (Bates et al., 1999) oder die schrittweise Freisetzung einzelner Guaninmononukleotide dokumentiert (Vaerman et al., 1997).

Alle die genannten Wirkungsmechanismen könnten theoretisch zur hier geschilderten antiproliferativen Wirkung guaninreicher ODN beitragen. Eine Abgrenzung durch Untersuchung der einzelnen Möglichkeiten war im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich.

### V.3. In vivo Aktivität guaninreicher Oligonukleotide

Ein Korrelat der in vitro nachgewiesenen Wirkungen guaninreicher ODN auf murine T-Lymphozyten konnte am lebenden Tier bislang nicht nachgewiesen werden. So führte die mehrfache intraperitoneale oder subkutane Applikation von GR1 nicht zu einer veränderten in vitro Aktivität der später entnommenen T-Zellen der behandelten Tiere. Auch hatten die guaninreichen ODN wohl keinen toxischen Effekt auf die Tiere, auch bei sehr hohen Dosen von über 50 nmol. Der Bauchsitus dieser Tiere war makroskopisch unauffällig. Leber, Milz und peritoneale Lymphknoten zeigten in Grösse, Form und Organfarbe keine Veränderungen. Die Zellzahlen von Milz und Lymphknoten entsprachen den Werten von unbehandelten Tieren.

Bei der in vivo Stimulation mit Staphylokokkenenterotoxin B (SEB) zeigte nur einen geringen Effekt auf die CD28 Expression. Die Zellzahl der durch SEB aktivierten  $V_{\beta}8^{+}$  T-Lymphozyten war gegenüber den unbehandelten Kontrollen unverändert.

Auch die Induktion spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch Immunisierung mit Ovalbumin und einem CpG - ODN als Adjuvans ist durch die Gabe guaninreicher ODN nicht beeinträchtigt worden. Auch fand sich bei den guaninreichen ODN selbst keine Adjuvanswirkung.

Diese mangelnde in vivo Wirksamkeit guaninreicher ODN könnte verschiedene Gründe haben:

Die hier in hochspezialisierten in vitro Assays beobachteten, gegensätzlichen Effekte, also kostimulatorische Wirkung auf der einen und antiproliferative Wirkung auf der anderen Seite, könnten sich unter physiologischen Bedingungen gegenseitig aufheben.

Ebenso ist denkbar, dass T-Zellen in vivo durch guaninreiche ODN gar nicht in genügend hoher Konzentration erreicht werden, weil sie vorher von Makrophagen der Lymphknoten oder der Leber aufgenommen werden (Bijsterbosch et al., 1997; Srinivasan und Iversen, 1995). Auch ist in diesem Zusammenhang nochmals hinzuweisen auf die im Vergleich zu Makrophagen

äußerst limitierte Kapazität ruhender T-Zellen ODN jedweder Art aufzunehmen (Krieg et al., 1991).

Trotz des bisher fehlenden Nachweises einer überzeugenden in vivo Wirkung guaninreicher Oligonukleotide bieten sich einige vielversprechende Ansätze für ihre therapeutische Anwendung.

Die Fähigkeit guaninreicher ODN T-Zellen koaktivieren, könnte in der Therapie von Tumoren genutzt werden. Manche Tumorzellen exprimieren zwar spezifische Antigene, die von T-Zellen erkannt werden könnten, aber es fehlt ihnen die gleichzeitige Expression kostimulatorischer Rezeptoren, wie B7.1 und B7.2. (Chen et al., 1993). Guaninreiche ODN könnten in einem solchen Fall die kostimulatorischen Signale ersetzen und so die Immunantwort gegen die Tumorzelle wiederherstellen. Bei Tumoren der lymphoiden Zellreihe könnte die beobachtete antiproliferative Wirkung eine zusätzliche eigenständige Antitumorwirkung der ODN mit sich bringen.

## VI. Zusammenfassung

Das ODN GR1 und andere guaninreiche Oligonukleotide wirken kostimulatorisch auf angereicherte  $\alpha$ -CD3 getriggerte murine T Zellen. Daraus resultiert Steigerung der IL-2 Rezeptorexpression, IL-2 Sekretion und nachfolgender IL-2 abhängiger Proliferation. Guaninreiche ODN sind darüber hinaus in der Lage in CD28 defizienten T-Lymphozyten das CD28 Signal zu ersetzen.

Kostimulatorisch aktiv waren Oligomere mit einem oder mehr Blöcken von je mindestens 4 Guaninbasen. Die ODN Aktivität konnte durch Polyanionen nicht spezifisch gehemmt werden, was gegen einen Einfluss des geladenen Phosphorothioatgerüsts spricht.

Im Kontrast zu ihrer wachstumsfördernden kostimulatorischen Wirkung bei  $\alpha$ -CD3 getriggerten T Zellen zeigen guaninreiche ODN unter Bedingungen einer optimalen Stimulation eine konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation. Dies zeigt sich in der Mixed Lymphocyte Reaction, Stimulation der T Zellen mit  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 oder PMA. In geringerem Ausmass wird auch die Expansion Concanavalin A aktivierter CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellblasten mittels IL-2 durch das ODN GR1 und ODN ähnlicher Struktur unterdrückt. Diese Hemmung der T Zellaktivität ist sequenzabhängig und tritt besonders bei ODN auf, die eine oder mehrere Tetraden von Guaninen enthalten.

Auch das Wachstum autonom proliferierender muriner und humaner Zelllinien wird durch GR1 negativ beeinflusst. Eine durch die guaninreichen Oligonukleotide induzierte stark vermehrte Apoptose der T-Lymphozyten konnte nicht nachgewiesen werden. Es kommt aber zur Downregulation des CD28 Moleküls auf murinen T-Zellen und gleichzeitig auch zur Verminderung anderer Aktivierungsmarker wie CD25 und CD69. Experimente mit T-Zellen aus CD28 <sup>-/-</sup> Mäusen zeigten keinen Unterschied in Bezug auf die inhibitorische Aktivität der Oligonukleotide, wodurch eine Wirkung über die Bindung an CD28 ausgeschlossen ist.

Die Stimulation von T-Zellen mit Ionomycin und PMA ist resistent gegenüber dem antiproliferativen Effekt der guaninreichen ODN, was einen Eingriff in proximal gelegene Signalwege nahelegte. Die Erhöhung des intrazellulären

Ca<sup>2+</sup>-Spiegels nach TZR Stimulation wurde durch die ODN jedoch nicht beeinflusst, was auf ein insgesamt intaktes TZR Signal schliessen lässt.

Entsprechende Korrelate der in vitro beobachteten Effekte durch guaninreiche ODN konnten im in vivo Versuch bisher nicht erfolgreich nachgewiesen werden. Unter anderem wurde die spezifische lytische Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach in vivo Immunisierung mit Ovalbumin untersucht. Hierbei zeigte sich bei den T-Zellen der mit guaninreichen ODN behandelten Mäusen kein Unterschied zu den jeweiligen Kontrollgruppen. Auch in der MLR und Stimulationen mit  $\alpha$ -CD3 Ak oder dem bakteriellen Superantigen SEB liessen sich die in vitro gewonnenen Ergebnisse am lebenden Tier nicht nachvollziehen.



**VII. Literaturverzeichnis**

- Antequera, F. and Bird, A.  
Number of CpG islands and genes in human and mouse.  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 90(24) (1993) 11995-11999
- Artandi, S. E. and DePinho, R. A.  
A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis.  
Curr.Opin.Genet.Dev. 10(1) (2000) 39-46
- Ballas, Z. K., Rasmussen, W. L., and Krieg, A. M.  
Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA.  
J.Immunol. 157 (1996) 1840-1845
- Bates, P. J., Kahlon, J. B., Thomas, S. D., Trent, J. O., and Miller, D. M.  
Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding.  
J.Biol.Chem. 274(37) (1999) 26369-26377
- Bendigs, S., Salzer, U., Lipford, G. B., Wagner, H., and Heeg, K.  
CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells.  
European Journal of Immunology 29(4) (1999) 1209-1218
- Benimetskaya, L., Berton, M., Kolbanovsky, A., Benimetsky, S., and Stein, C. A.  
Formation of a G-tetrad and higher order structures correlates with biological activity of the RelA (NF-kappaB p65) 'antisense' oligodeoxynucleotide.  
Nucleic.Acids.Res. 25(13) (1997) 2648-2656
- Benimetskaya, L., Loike, J. D., Khaled, Z., Loike, G., Silverstein, S. C., Cao, L., el Khoury, J., Cai, T. Q., and Stein, C. A.  
Mac-1 (CD11b/CD18) is an oligodeoxynucleotide-binding protein (see comments).  
Nat.Med. 3(4) (1997) 414-420
- Bijsterbosch, M. K., Manoharan, M., Rump, E. T., De Vruet, R. L., van Veghel, R., Tivel, K. L., Biessen, E. A., Bennett, C. F., Cook, P. D., and van Berkel, T. J.  
In vivo fate of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: predominant uptake by scavenger receptors on endothelial liver cells.  
Nucleic.Acids.Res. 25(16) (1997) 3290-3296
- Bird, A. P.  
Functions for DNA methylation in vertebrates.  
Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. 58 (1993) 281-285

Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. A., Vermaas, E. H., and Toole, J. J.  
Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin.

Nature 355(6360) (1992) 564-566

Boussiotis, V. A., Gribben, J. G., Freeman, G. J., and Nadler, L. M.

Blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: a means to induce tolerance.  
Curr.Opin.Immunol. 6(5) (1994) 797-807

Bretscher, P. and Cohn, M.

A theory of self-nonsel self discrimination.

Science 169(950) (1970) 1042-1049

Brightbill, H. D. and Modlin, R. L.

Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response.

Immunology 101(1) (2000)1-10

Brown, D. A. and London, E.

Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts.

J.Biol.Chem. 275(23) (2000) 17221-17224

Carpentier, A. F., Xie, J., Mokhtari, K., and Delattre, J. Y.

Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs.

Clin.Cancer Res. 6(6) (2000) 2469-2473

Chen, L., Linsley, P. S., and Hellstrom, K. E.

Costimulation of T cells for tumor immunity.

Immunol.Today 14(10) (1993) 483-486

Cross, S. H. and Bird, A. P.

CpG islands and genes.

Curr.Opin.Genet.Dev. 5(3) (1995) 309-314

Davis, M. M. and Bjorkman, P. J.

T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.

Nature 334(6181) (1988) 395-402

Gross, J. A., Callas, E., and Allison, J. P.

Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse.

J.Immunol. 149(2) (1992) 380-388

Häcker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Lipford, G. B., and Wagner, H.

CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation.

EMBO J. 17 (1998) 6230-6240

Hartmann, G., Weiner, G. J., and Krieg, A. M.

CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 96(16) (1999) 9305-9310

Heeg, K.

CpG DNA Co-Stimulates Antigen reactive T Cells.

in „Immunobiology of bacterial CpG DNA“

Wagner, H.(editor) , Springer Verlag.

Berlin, Volume 247 (2000) 93-105

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S.

A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.

Nature. 408(6813) (2000) 740-745

Jakob, T., Walker, P. S., Krieg, A. M., Udey, M. C., and Vogel, J. C.

Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA.

J.Immunol., 161 (1998) 3042-3049

Jin, R., Gaffney, B. L., Wang, C., Jones, R. A., and Breslauer, K. J.

Thermodynamics and structure of a DNA tetraplex: a spectroscopic and calorimetric study of the tetramolecular complexes of d(TG3T) and d(TG3T2G3T).

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 89(18) (1992) 8832-8836

June, C. H., Bluestone, J. A., Nadler, L. M., and Thompson, C. B.

The B7 and CD28 receptor families.

Immunol.Today 15(7) (1994) 321-331

Kang, C., Zhang, X., Ratliff, R., Moyzis, R., and Rich, A.

Crystal structure of four-stranded Oxytricha telomeric DNA.

Nature 356(6365) (1992) 126-131

Karlin, S., Doerfler, W., and Cardon, L. R.

Why is CpG suppressed in the genomes of virtually all small eukaryotic viruses but not in those of large eukaryotic viruses?

J.Virol. 68(5) (1994) 2889-2897

Kataoka, T., Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kuramoto, E., Kimura, Y., Yano, O., and Tokunaga, T.

Antitumor activity of synthetic oligonucleotides with sequences from cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG.

Jpn.J.Cancer Res. 83 (1992) 244-247

Kerwin, S. M.

G-Quadruplex DNA as a target for drug design.

Curr.Pharm.Des. 6(4) (2000) 441-478

Khaled, Z., Benimetskaya, L., Zeltser, R., Khan, T., Sharma, H. W., Narayanan, R., and Stein, C. A.

Multiple mechanisms may contribute to the cellular anti-adhesive effects of phosphorothioate oligodeoxynucleotides.

Nucleic.Acids.Res. 24(4) (1996) 737-745

Kitajima, I., Unoki, K., and Maruyama, I.

Phosphorothioate oligodeoxynucleotides inhibit basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo.

Antisense Nucleic.Acid Drug Dev. 9(2) (1999) 233-239

Kline, J. N.

Effects of CpG DNA on Th1/Th2 balance in asthma.

Curr.Top.Microbiol.Immunol. 247(1-2) (2000) 211-225

Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J., and Krieg, A. M.

CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 93 (1996) 2879-2883

Krieg, A. M., Gmelig-Meyling, F., Gourley, M. F., Kisch, W. J., Chrisey, L. A., and Steinberg, A. D. Uptake of oligodeoxyribonucleotides by lymphoid cells is heterogeneous and inducible.

Antisense Res.Dev. 1(2) (1991) 161-171

Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., and Klinman, D. M.

CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation.

Nature 374 (1995) 546-549

Krieg, A. M.

Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA.

Trends.Microbiol. 4 (1996) 73-76

Kuramoto, E., Yano, O., Kimura, Y., Baba, M., Makino, T., Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., and Tokunaga, T.

Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation.

Jpn.J.Cancer Res. 83 (1992) 1128-1131

- Lafferty, K. J. and Woolnough, J.  
The origin and mechanism of the allograft reaction.  
*Immunol.Rev.* 35 (1977) 231-262
- Lang, R., Itner, L., Lipford, G. B., Wagner, H., and Heeg, K.  
Guanosine-rich oligodeoxynucleotides induce proliferation of macrophage progenitors in cultures of murine bone marrow cells.  
*European Journal of Immunology* 29(11) (1999) 3496-3506
- Lee, P. P., Ramanathan, M., Hunt, C. A., and Garovoy, M. R.  
An oligonucleotide blocks interferon-gamma signal transduction.  
*Transplantation* 62(9) (1996) 1297-1301
- Lee, S. W., Song, M. K., Baek, K. H., Park, Y., Kim, J. K., Lee, C. H., Cheong, H. K., Cheong, C., and Sung, Y. C.  
Effects of a hexameric deoxyriboguanosine run conjugation into CpG oligodeoxynucleotides on their immunostimulatory potentials.  
*J.Immunol.* 165(7) (2000) 3631-3639
- Lipford, G. B., Bauer, M., Blank, C., Reiter, R., Wagner, H., and Heeg, K.  
CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants.  
*European Journal of Immunology* 27 (1997) 2340-2344
- Lipford, G. B., Bendigs, S., Heeg, K., and Wagner, H.  
Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines.  
*Immunology* 101(1) (2000) 46-52
- Liu, Y., Jones, B., Aruffo, A., Sullivan, K. M., Linsley, P. S., and Janeway, C. A.  
Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth.  
*J.Exp.Med.* 175(2) (1992) 437-445
- Mata, J. E., Joshi, S. S., Palen, B., Pirruccello, S. J., Jackson, J. D., Elias, N., Page, T. J., Medlin, K. L., and Iversen, P. L.  
A hexameric phosphorothioate oligonucleotide telomerase inhibitor arrests growth of Burkitt's lymphoma cells in vitro and in vivo.  
*Toxicol.Appl.Pharmacol.* 144(1) (1997) 189-197
- Matzinger, P.  
Tolerance, danger, and the extended family.  
*Annu.Rev.Immunol.* 12 (1994) 991-1045
- McCluskie, M. J., Weeratna, R. D., and Davis, H. L.  
The role of CpG in DNA vaccines.  
*Springer Semin.Immunopathol.* 22(1-2) (2000) 125-132.

Monteith, D. K., Henry, S. P., Howard, R. B., Flournoy, S., Levin, A. A., Bennett, C. F., and Crooke, S. T.

Immune stimulation--a class effect of phosphorothioate oligodeoxynucleotides in rodents.

Anticancer Drug Des. 12 (1997) 421-432

Mueller, D. L., Jenkins, M. K., and Schwartz, R. H.

Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy.

Annu.Rev.Immunol. 7 (1989) 445-480

Mueller, D. L., Seiffert, S., Fang, W., and Behrens, T. W.

Differential regulation of bcl-2 and bcl-x by CD3, CD28, and the IL-2 receptor in cloned CD4+ helper T cells. A model for the long-term survival of memory cells.

J.Immunol. 156(5) (1996) 1764-1771

Najjam, S., Mulloy, B., Theze, J., Gordon, M., Gibbs, R., and Rider, C. C.

Further characterization of the binding of human recombinant interleukin 2 to heparin and identification of putative binding sites.

Glycobiology. 8(5) (1998) 509-516

Noel, P. J., Boise, L. H., Green, J. M., and Thompson, C. B.

CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation.

J.Immunol. 157(2) (1996) 636-642

Ogoshi, M., Takashima, A., and Taylor, R. S.

Mechanisms regulating telomerase activity in murine T cells.

J.Immunol. 158(2) (1997) 622-628

Ormerod, M.G.

„Flow cytometry – a practical approach“ 2<sup>nd</sup> ed.

Oxford University Press, New York/Tokyo, 1994

Page, T. J., Mata, J. E., Bridge, J. A., Siebler, J. C., Neff, J. R., and Iversen, P. L.

The cytotoxic effects of single-stranded telomere mimics on OMA-BL1 cells.

Exp.Cell Res. 252(1) (1999) 41-49

Patel, V. P., Moran, M., Low, T. A., and Miceli, M. C.

A Molecular Framework for Two-Step T Cell Signaling: Lck Src Homology 3 Mutations Discriminate Distinctly Regulated Lipid Raft Reorganization Events.

J.Immunol. 166(2) (2001) 754-764

Pearson, A. M., Rich, A., and Krieger, M.

Polynucleotide binding to macrophage scavenger receptors depends on the formation of base-quartet-stabilized four-stranded helices.

J.Biol.Chem. 268(5) (1993) 3546-3554

- Pisetsky, D. S.  
Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code.  
*Immunity*. 5 (1996) 303-310
- Pisetsky, D. S.  
Immunostimulatory DNA: a clear and present danger? (news; comment).  
*Nat.Med.* 3 (1997) 829-831
- Radvanyi, L. G., Shi, Y., Vaziri, H., Sharma, A., Dhala, R., Mills, G. B., and Miller, R. G.  
CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response.  
*J.Immunol.* 156(5) (1996) 1788-1798
- Saijo, Y., Uchiyama, B., Abe, T., Satoh, K., and Nukiwa, T.  
Contiguous four-guanosine sequence in c-myc antisense phosphorothioate oligonucleotides inhibits cell growth on human lung cancer cells: possible involvement of cell adhesion inhibition.  
*Jpn.J.Cancer Res.* 88(1) (1997) 26-33
- Saretzki, G., Sitte, N., Merkel, U., Wurm, R. E., and von Zglinicki, T.  
Telomere shortening triggers a p53-dependent cell cycle arrest via accumulation of G-rich single stranded DNA fragments.  
*Oncogene* 18(37) (1999) 5148-5158
- Schwartz, R. H.  
Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy.  
*Cell* 71(7) (1992) 1065-1068
- Schwartz, R. H.  
T cell clonal anergy.  
*Curr.Opin.Immunol.* 9(3) (1997) 351-357
- Sen, D. and Gilbert, W.  
A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA.  
*Nature* 344(6265) (1990) 410-414
- Simons, K. and Ikonen, E.  
Functional rafts in cell membranes.  
*Nature* 387(6633) (1997) 569-572
- Sonehara, K., Saito, H., Kuramoto, E., Yamamoto, S., Yamamoto, T., and Tokunaga, T.  
Hexamer palindromic oligonucleotides with 5'-CG-3' motif(s) induce production of interferon.  
*J.Interferon.Cytokine.Res.* 16 (1996) 799-803

Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Hacker, H., Heeg, K., and Wagner, H. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated shock.  
European Journal of Immunology 27 (1997) 1671-1679

Sprent, J.  
Central tolerance of T cells.  
Int.Rev.Immunol. 13(2) (1995) 95-105

Sprent, J. and Webb, S. R.  
Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells.  
Curr.Opin.Immunol. 7(2) (4-1995) 196-205

Srinivasan, S. K. and Iversen, P.  
Review of in vivo pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate oligonucleotides.  
J.Clin.Lab.Anal. 9(2) (1995) 129-137

Stein, C. A., Neckers, L. M., Nair, B. C., Mumbauer, S., Hoke, G., and Pal, R.  
Phosphorothioate oligodeoxycytidine interferes with binding of HIV-1 gp120 to CD4.  
J.Acquir.Immune.Defic.Syndr. 4(7) (1991) 686-693

Stein, C. A. and Cheng, Y. C.  
Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical?  
Science 261(5124) (1993) 1004-1012.

Stein, C. A. and Narayanan, R.  
Antisense oligodeoxynucleotides.  
Curr.Opin.Oncol. 6(6) (1994) 587-594

Sun, J. S. and Helene, C.  
Oligonucleotide-directed triplex-helix formation.  
Curr.Opin.Struct.Biol. 3 (1993) 345-356

Suzuki, J., Miyano-Kurosaki, N., Takeuchi, H., Tamura, Y., Kawai, G., Takai, K., Tanaka, Y., Tanaka, R., Yamamoto, N., and Takaku, H.  
Phosphorothioate G3T4G3 motifs inhibits the early stage of HIV-1 infection.  
Nucleic.Acids.Symp.Ser. (42) (1999) 227-228

Takahashi, C., Mittler, R. S., and Vella, A. T.  
Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal.  
J.Immunol. 162(9) (1999) 5037-5040

Tam, R. C., Lin, C. J., Lim, C., Pai, B., and Stoisavljevic, V.  
Inhibition of CD28 expression by oligonucleotide decoys to the regulatory element in exon 1 of the CD28 gene.  
J.Immunol. 163(8) (1999) 4292-4299



Tam, R. C., Phan, U. T., Milovanovic, T., Pai, B., Lim, C., Bard, J., and He, L.  
Oligonucleotide-mediated inhibition of CD28 expression induces human T cell hyporesponsiveness and manifests impaired contact hypersensitivity in mice.  
*J.Immunol.* 158 (1997) 200-208

Tan, P., Anasetti, C., Hansen, J. A., Melrose, J., Brunvand, M., Bradshaw, J., Ledbetter, J. A., and Linsley, P. S.  
Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1.  
*J.Exp.Med.* 177(1) (1993) 165-173

Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., and Sudo, T.  
Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity.  
*J.Natl.Cancer Inst.* 72(4) (1984) 955-962

Tokunaga, T., Yano, O., Kuramoto, E., Kimura, Y., Yamamoto, T., Kataoka, T., and Yamamoto, S.  
Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells.  
*Microbiol.Immunol.* 36 (1992) 55-66

Turka, L. A., Ledbetter, J. A., Lee, K., June, C. H., and Thompson, C. B.  
CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3+ mature thymocytes.  
*J.Immunol.* 144(5) (1990) 1646-1653

Vaerman, J. L., Moureau, P., Deldime, F., Lewalle, P., Lammineur, C., Morschhauser, F., and Martiat, P.  
Antisense oligodeoxyribonucleotides suppress hematologic cell growth through stepwise release of deoxyribonucleotides.  
*Blood* 90(1) (1997) 331-339

Valitutti, S., Muller, S., Salio, M., and Lanzavecchia, A.  
Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation.  
*J.Exp.Med.* 185(10) (1997) 1859-1864

Van Seventer, G. A., Shimizu, Y., Horgan, K. J., and Shaw, S.  
The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells.  
*J.Immunol.* 144(12) (1990) 4579-4586

Vella, A. T., Mitchell, T., Groth, B., Linsley, P. S., Green, J. M., Thompson, C. B., Kappler, J. W., and Marrack, P.  
CD28 engagement and proinflammatory cytokines contribute to T cell expansion and long-term survival in vivo.  
J.Immunol. 158(10) (1997) 4714-4720

von Boehmer, H.  
Positive selection of lymphocytes.  
Cell 76(2) (1994) 219-228

Wagner, H.  
Immunobiology of bacterial CpG DNA.  
(247) (2000) Berlin, Springer Verlag.

Watts, T. H. and DeBenedette, M. A.  
T cell co-stimulatory molecules other than CD28.  
Curr.Opin.Immunol. 11(3) (1999) 286-293

Wyatt, J. R., Vickers, T. A., Roberson, J. L., Buckheit, R. W. Jr, Klimkait, T., DeBaets, E., Davis, P. W., Rayner, B., Imbach, J. L., and Ecker, D. J.  
Combinatorially selected guanosine-quartet structure is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus envelope-mediated cell fusion.  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 91(4) (1994) 1356-1360

Yakubov, L., Khaled, Z., Zhang, L. M., Truneh, A., Vlassov, V., and Stein, C. A.  
Oligodeoxynucleotides interact with recombinant CD4 at multiple sites.  
J.Biol.Chem. 268(25) (1993) 18818-18823

Yamamoto, S., Kuramoto, E., Shimada, S., and Tokunaga, T.  
In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG.  
Jpn.J.Cancer Res. 79(7) (1988) 866-873

Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O., and Tokunaga, T.  
Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN (correction of INF) and augment IFN-mediated (correction of INF) natural killer activity.  
J.Immunol. 148 (1992) 4072-4076

Yashiro-Ohtani, Y., Zhou, X. Y., Toyo-Oka, K., Tai, X. G., Park, C. S., Hamaoka, T., Abe, R., Miyake, K., and Fujiwara, H.  
Non-CD28 costimulatory molecules present in T cell rafts induce T cell costimulation by enhancing the association of TCR with rafts.  
J.Immunol. 164(3) (2000) 1251-1259

- Yaswen, P., Stampfer, M. R., Ghosh, K., and Cohen, J. S.  
Effects of sequence of thioated oligonucleotides on cultured human  
mammary epithelial cells.  
*Antisense Res.Dev.* 3(1) (1993) 67-77
- Yi, A. K., Klinman, D. M., Martin, T. L., Matson, S., and Krieg, A. M.  
Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction  
of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway.  
*J.Immunol.* 157 (1996) 5394-5402
- Zhao, Q., Song, X., Waldschmidt, T., Fisher, E., and Krieg, A. M.  
Oligonucleotide uptake in human hematopoietic cells is increased in  
leukemia and is related to cellular activation.  
*Blood* 88(5) (1996) 1788-1795
- Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C.  
Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic  
choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system.  
*Nature* 248(450) (1974) 701-702



## VIII. Danksagung

Mein Dank gilt

- ... an erster Stelle Prof. Klaus Heeg für die Betreuung der Arbeit und seinen Enthusiasmus, der mich für Immunologie und Forschung begeistert hat.
- ... Herrn Prof. Hermann Wagner, an dessen Institut ich diese Arbeit anfertigen durfte und der für meine Anliegen immer ein offenes Ohr hatte.
- ... den technischen Assistentinnen Silvia Bendigs und Susanne Hausmann für die technische Anleitung und Einarbeitung.
- ... allen meinen Labormitstreiterinnen und –mitstreitern, für eine sicher einmalige Arbeitsatmosphäre, die vieles erleichtert und neben der reinen Wissenschaft eine grosse Bereicherung war.
- ... der Deutschen Forschungsgemeinschaft, welche mich im Rahmen des Graduiertenkollegs 333 mit einem Stipendium unterstützte.
- ... Frau Dr. Martina Haasemann und Prof. Dr. Manfred Gratzl für die Organisation und Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs 333.
- ... meinen Eltern für Ihre Liebe, Ihr Vertrauen und Ihre seelische Unterstützung.

