

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr., Dr. h.c. H. Wagner, Ph. D. (Melbourne))

Direkte und indirekte Effekte von CpG-Oligodeoxynukleotiden auf humane T-Lymphozyten

Katharina Theresa Kranzer

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., Dr. h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne)
2. Univ.-Prof. Dr. K. D. Pfeffer

Die Dissertation wurde am 05.06.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 14.11.2001 angenommen.

Abkürzungen:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
APZ	Antigen präsentierende Zelle/ Zellen
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	bovines Serumalbumin
CD	„cluster of differentiation antigene“
CFA	vollständiges Freund'sches Adjuvans („complete Freund's adjuvant“)
CpG	Cytosin-Guanosin
CT	Threshold-Cycle
cpm	„counts per minute“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle/ Zellen
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsorter
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FS	Forward Scatter
HBSS	„Hank's balanced“ Salzlösung
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethanolsulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen
ICAM	interzelluläre Adhensionsmolekül („intercellular adhesion molecule“)
IFN	Interferon

IL	Interleukin
LFA	Leukozytenintegrine („lymphocyte function-associated antigen“)
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
NF- κ B	„nuclear factor κ B“
NK Zellen	natürliche Killerzellen
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
ODP	o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid
PAMP	Pathogen assoziierte molekulare Muster („pathogen-associated molecular patterns“)
PBMZ	Peripherblut mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinchlorophyllprotein
PFA	Paraformaldehyd
PRR	Muster erkennender Rezeptor („pattern recognition receptors“)
RT	Raumtemperatur
SS	Sideward Scatter
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
TZR	T-Zellrezeptor
ZTL	zytotoxischer T-Lymphozyt

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	6
1.1	Das Immunsystem.....	6
1.1.1	Die T-Zelle	7
1.1.2	Die antigenpräsentierende Zelle (APZ).....	8
1.1.3	Die Interaktion zwischen T-Lymphozyt und APZ.....	10
1.1.4	Die Differenzierung von T _H 1- und T _H 2-Zellen.....	10
1.1.5	Herkunft und Funktion der Zytokine.....	12
1.2	Bakterielle DNA und synthetische CpG-Oligodeoxynukleotide (ODN) als Aktivatoren von Immunzellen.....	13
1.2.1	Immunstimulatorische Wirkung von ODN im murinen Immunsystem.....	14
1.2.1.1	Wirkung der CpG-ODN auf APZ.....	14
1.2.1.2	Wirkung der CpG-ODN auf T-Lymphozyten	15
1.2.2	Immunstimulatorische Wirkung von ODN im humanen Immunsystem.....	16
2	Fragestellung	17
3	Material und Methoden.....	18
3.1	Medien und Reagenzien für die Zellkultur.....	18
3.1.1	Zellkulturmedium zur Kultivierung primärer Zellen.....	18
3.1.2	Eosin Färbelösung.....	18
3.1.3	Paraformaldehyd-Fixierlösung (PFA).....	19
3.1.4	Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS).....	19
3.1.5	Zytokine.....	19
3.1.5.1	IL-2.....	19
3.1.5.2	IL-12.....	19
3.1.5.3	IFN α	20
3.1.6	Antikörper.....	20
3.1.6.1	T-Lymphozyten stimulierende Antikörper.....	20
3.1.6.2	Zytokin neutralisierende Antikörper.....	20
3.1.7	ODN.....	21
3.2	Zellisolation und -kultivierung.....	22
3.2.1	Zellisolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut durch Dichtegradientenzentrifugation..	22
3.2.2	Isolation von T-Lymphozyten	22
3.2.2.1	Isolation von T-Lymphozyten aus PBMZ.....	22
3.2.2.2	Isolation von T-Lymphozyten aus Tonsillen	23
3.2.3	Zellkultivierung.....	23
3.2.4	Stimulation von gereinigten T-Lymphozyten mit immobilisierten Antikörpern	23
3.2.5	Kultivierung von T-Zellblasten.....	24
3.2.6	Stimulation von gereinigten T-Lymphozyten im Transwell-System.....	24
3.3	Methoden.....	24
3.3.1	Proliferationsassay	24
3.3.2	Messung der Zytokinproduktion.....	25
3.3.2.1	Elisa (Enzyme linked immuno sorbend assay).....	25
3.3.2.2	Intrazelluläre Färbungen	25
3.3.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
3.3.3	Messung der Expression von Oberflächenantigenen mittels Durchflußzytometrie (FACS).....	28
4	Ergebnisse	31
4.1	ODN auf gereinigten humanen T-Lymphozyten.....	31
4.1.1	Etablierung eines Systems zur Kostimulation von T-Zellen.....	31
4.1.2	Untersuchung der kostimulierenden Wirkung von ODN auf ruhende T-Lymphozyten unter Verwendung von submitogenen Konzentrationen des Signal 1	32
4.1.2.1	Effekte von phosphorotioatstabilisierten ODN auf T-Zellen aus PBMZ.....	32
4.1.2.2	Wirkung von Phosphodiester-ODN und „teilprotektierten“ ODN auf T-Zellen.....	35
4.1.2.3	Effekte der ODN auf T-Lymphozyten aus Tonsillen	36

4.1.3	Untersuchung der Wirkung von ODN auf aktivierte T-Lymphozyten unter Verwendung von mitogenen Konzentrationen des Signal 1	36
4.1.3.1	Proliferation.....	36
4.1.3.2	Expression von Oberflächenmolekülen.....	38
4.1.3.3	Zytokinproduktion.....	40
4.1.3.4	Zeitpunkt der ODN-Zugabe.....	41
4.2	Indirekte Effekte von ODN auf humane T-Zellen, die sich in einem PBMZ-Verband befinden	43
4.2.1	Etablierung eines Systems zur Stimulation von T-Lymphozyten in Anwesenheit anderer mononukleärer Zellen.....	43
4.2.2	Untersuchung indirekter Effekte der ODN auf humane T-Zellen.....	44
4.2.2.1	Expression von Oberflächenmolekülen.....	44
4.2.2.2	Zytokinproduktion.....	48
4.2.2.3	ODN-Konzentration.....	53
4.2.3	Charakterisierung der indirekten Effekte der ODN auf T-Zellen.....	55
4.2.3.1	Transwell-System.....	55
4.2.3.2	CpG-ODN induzierte IFN α -Produktion.....	56
4.2.3.3	Inhibition der ODN-Effekte durch neutralisierender Antikörper.....	57
4.2.3.4	Stimulation mit rekombinantem IL-12 und IFN Typ I.....	60
4.2.3.5	Überstandstransfer.....	63
5	Diskussion.....	65
5.1	ODN zeigen keine kostimulatorische Wirkung auf gereinigte humane T-Lymphozyten.....	65
5.2	T-Zellen, die innerhalb eines PBMZ-Verbandes mit löslichem anti human CD3 als Signal 1 und CpG-ODN stimuliert werden, zeigen eine partielle Aktivierung.....	66
5.3	Die Stimulation von PBMZ mit löslichem anti human CD3 und CpG-ODN induziert IFN γ Produktion in T-Lymphozyten und NK-Zellen.....	68
5.4	CpG-ODN können in Zukunft vielleicht als Adjuvans therapeutisch genutzt werden.....	70
6	Zusammenfassung	72
7	Literaturverzeichnis	73

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Unser Körper ist ständig damit beschäftigt, Fremdkörper und potentielle Krankheitserreger abzuwehren. Diese Aufgabe hat das Immunsystem übernommen. Das Immunsystem setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, dem angeborenen Immunsystem und dem adaptiven Immunsystem. Diese Trennung existiert nur theoretisch, da beide Komponenten eng miteinander verflochten sind, wie z.B. an Hand des Zusammenspiels antigenpräsentierender Zellen (APZ) und Lymphozyten deutlich wird (Lo 1999). Außerdem stimmen die Effektormechanismen der angeborenen mit denen der adaptiven Immunität prinzipiell überein, so daß man annehmen kann, daß das adaptive Immunsystem eine Weiterentwicklung des angeborenen Immunsystems darstellt (Medzhitow 1998, Medzhitow 1997).

Das angeborene Immunsystem besteht aus humoralen Bestandteilen, wie dem Komplementsystem, dem Lysozym und den Proteinen der „akuten Phase“ und aus zellulären Bestandteilen zu denen die Granulozyten zählen, als auch die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und die Makrophagen zählen. Die angeborene Immunantwort ist nicht antigenspezifisch und erzeugt kein immunologisches Gedächtnis.

Das adaptive Immunsystem setzt sich aus T- und B-Lymphozyten zusammen. Die T-Zellen sind für die zelluläre Abwehr zuständig, die B-Zellen bilden durch Differenzierung in Antikörper sezernierende Plasmazellen den humoralen Teil dieses Systems. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem, dessen Aktivierung antigenunspezifisch erfolgt, z.B. durch Lipopolysacharid (LPS) gramnegativer Bakterien (Ulevitch 1999), wird eine adaptive Immunantwort erst durch ein bestimmtes Antigen ausgelöst. Diese Immunantwort ist durch das Prinzip der klonalen Selektion gekennzeichnet, d.h. es kommt zur Aktivierung und Proliferation von Zellen, die spezifisch auf das Antigen reagieren. Die adaptive Immunantwort hinterläßt ein immunologisches Gedächtnis, das eine schnellere und stärkere Reaktion bei erneutem Zusammentreffen mit demselben Antigen ermöglicht.

1.1.1 Die T-Zelle

Die Reifung der T-Zellen findet im Thymus statt. Von dort gelangen sie ins Blut und auf diesem Weg auch in die peripheren lymphatischen Organe (Res 1999, Haynes 1998). Die Zirkulation zwischen Blut und peripherem lymphatischem Gewebe dauert so lange, bis die T-Zelle auf ihr spezifisches Antigen trifft und im Rahmen der adaptiven Immunantwort zur klonalen Expansion angeregt wird. Man unterscheidet innerhalb der T-Zellpopulation die naiven T-Zellen, die noch nicht auf ihr spezifisches Antigen gestoßen sind und die Gedächtnis-T-Zellen, die bereits mit ihrem spezifischen Antigen konfrontiert wurden und Teil des immunologischen Gedächtnisses sind. Da diese beiden Zelltypen unterschiedliche Isoformen des CD45-Moleküls exprimieren (Clement 1991, Beverley 1991), können durch Färbung dieser Oberflächenmoleküle die beiden T-Zellphänotypen von einander unterschieden werden.

T-Zellen besitzen zur Antigenerkennung T-Zellrezeptoren (TZR). Dabei handelt es sich um ein membrangebundenes Polypeptid-Heterodimer (Bentley 1996), das mit dem CD3-Komplex und einem zytoplasmatisch gerichteten Homodimer assoziiert ist. Das Heterodimer des TZR besteht bei der Mehrzahl der T-Zellen aus einer α - und einer β -Polypeptidkette, während etwa 5 % der T-Zellen einen TZR mit einer γ - und einer δ -Polypeptidkette exprimieren. Nach Erkennung eines Antigens durch den $\alpha\beta$ TZR, erfolgt die intrazelluläre Signalübertragung über den CD3-Komplex und die ζ -Ketten des Homodimers. Um mit jedem Antigen spezifisch interagieren zu können, muß es eine immense Zahl von unterschiedlichen TZR geben. Die Gene der beiden TZR-Ketten bestehen aus mehreren Regionen. Für jede Region steht eine gewisse Anzahl an unterschiedlichen Segmenten auf Keimbahnebene zur Verfügung. Die Diversität des TZR wird einerseits durch somatische Rekombination der Segmente für die unterschiedlichen Regionen erreicht, andererseits durch die ungenaue Verknüpfung der einzelnen Regionen durch die terminalen Transferasen (Wang 1997, Gilfillan 1995).

Wie bereits erwähnt sind T-Zellen für die zellvermittelte Immunität verantwortlich. Sie erkennen das Antigen nicht in löslicher Form wie die B-Zellen, sondern in Kombination mit speziellen Präsentationsmolekülen. Diese Moleküle werden als Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“ = MHC) bezeichnet. MHC-Moleküle lassen sich in zwei Klassen einteilen. Klasse I-Moleküle (MHC I) finden sich mit Ausnahme der Erythrozyten auf allen Körperzellen und präsentieren vor allem „Selbstpeptide“. Zellen, die von einem Virus infiziert sind, präsentieren die viralen Proteine zusammen mit dem MHC I

und können so vom Immunsystem erkannt werden. Klasse II-Moleküle (MHC II) werden nur von antigenpräsentierenden Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Diese Zellen phagozytieren Antigene und präsentieren diese den T-Zellen.

Für die Interaktion zwischen dem TZR und einem MHC-Molekül braucht die T-Zelle einen Korezeptor. Dieser Korezeptor ist entweder CD8 oder CD4 und legt fest mit welcher Klasse der MHC-Moleküle die Zelle interagiert. CD8-Zellen erkennen Peptidantigene, die zusammen mit Klasse I-Molekülen präsentiert werden und zerstören im Anschluß an diese Interaktion ihre Zielzelle. Deswegen werden die CD8-Zellen auch zytotoxische T-Zellen genannt. CD4-T-Zellen interagieren mit APZ und werden als T-Helferzellen bezeichnet, da ihnen eine zentrale Bedeutung bei der Modulation und Steuerung der Immunantwort zukommt (Janeway 1988).

Um eine klonale Expansion von T-Lymphozyten zu erreichen sind nicht nur spezifische Liganden, sondern auch kostimulatorische Signale der präsentierenden Zelle notwendig, d.h. neben dem Signal 1, das TZR vermittelt ist, muß die T-Zelle noch durch ein Signal 2, z.B. über CD28 aktiviert werden (Lenschow 1996). Denn die alleinige Stimulation über den TZR-CD3-Komplex ohne Kostimulus führt zu einem Zustand der als Anergie bezeichnet wird (Medema 1999, Schwartz 1996). Im Verlauf einer vollständigen T-Zellstimulation produziert die T-Zelle den Wachstumsfaktor Interleukin-2 (IL-2), exprimiert verstärkt den IL-2-Rezeptor und proliferiert.

1.1.2 Die antigenpräsentierende Zelle (APZ)

Zu den APZ zählen die B-Zellen, die Makrophagen und die dendritischen Zellen (DZ), die sich sowohl hinsichtlich ihrer Fähigkeit Antigen aufzunehmen als auch bezüglich ihrer Möglichkeiten aktivierende Faktoren zu produzieren unterscheiden. APZ müssen Peptidfragmente auf beiden Klassen von MHC-Molekülen präsentieren können und gleichzeitig ein kostimulatorisches Signal, wie z.B. B7, überbringen.

Diese Voraussetzungen werden von ruhenden Makrophagen nicht erfüllt. Ruhende Makrophagen können zwar gut phagozytieren, aber es fehlen ihnen kostimulatorische Moleküle. Durch die Aufnahme von Mikroorganismen wird die Expression von B7 und MHC II-Molekülen induziert, so daß die Makrophagen zu professionellen APZ werden.

DZ findet man in den meisten Körpergeweben, wie z.B. in der Haut, im Respirationstrakt und in lymphatischen Geweben. Ihre Fähigkeit Antigen aufzunehmen ist gut

ausgebildet, da sie sowohl zur Phagozytose (Moll 1993), zur Makropinozytose als auch zur adsorptiven Endozytose fähig sind (Banherau 1998). Letzteres ist auf spezielle Rezeptoren wie z.B. dem Makrophagen Mannose Rezeptor, dem DEC-205 und den Fc γ - und Fc ϵ -Rezeptoren zurückzuführen (Sallusto 1994, Jiang 1995). Um an einer Immunantwort teilnehmen zu können muß die DZ eine Reifung durchlaufen. Der Reifungsprozeß der DZ wird durch proinflammatorische Zytokine beeinflusst, deren Produktion und Freisetzung durch Pathogen assoziierte Moleküle („pathogen-associated molecular patterns“ = PAMP), die im Sinne eines „danger-signals“ wirken, vermittelt wird. Diese Moleküle wirken über „pattern recognition receptors“ zu denen z.B. die Toll-Rezeptoren und CD14 gehören (Janeway 1998). Zu den proinflammatorischen Zytokinen, die eine Reifung der DZ fördern gehören Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) (Buelens 1997). Andererseits sind aber auch PAMP wie z.B. das von gramnegativen Bakterien stammende LPS in der Lage die Reifung der DZ direkt zu induzieren (Sallusto 1995). Die reife DZ ist gekennzeichnet durch eine hohe Dichte von MHC-Molekülen beider Klassen auf der Zelloberfläche (Inaba 1997). Sie exprimiert eine große Zahl akzessorischer Moleküle zur Kostimulation, wie z.B. B7-2, und zur Adhäsion, wie Leukozytenintegrine („lymphocyte function-associated antigen“ = LFA) und das interzelluläre Adhäsionsmolekül („intercellular adhesion molecule“ = ICAM-1), und produziert Interleukin-12 (IL-12). Jedoch verliert die DZ im Laufe des Reifungsvorgangs die Fähigkeit Antigene so potent zu endo- und phagozytieren wie sie es als immature DZ konnte. Im weiteren Verlauf der Immunantwort wandert die DZ in lymphatisches Gewebe und schließt dort ihre Reifung ab. Durch Freisetzung von Zytokinen lockt sie T- und B-Lymphozyten an, denen sie auf ihren MHC-Molekülen körpereigene Antigene und prozessierte körperfremde Antigene präsentiert. Die körpereigenen Antigene lösen keine T-Zellaktivierung aus, da die autoreaktiven T-Zellen bereits im Thymus depletiert wurden.

Die Zuordnung der B-Lymphozyten zu den APZ ist nicht unumstritten, da ihre Fähigkeit zur Kostimulation gering ausgeprägt ist. B-Lymphozyten binden mit Hilfe von zellmembranständigen Immunglobulinen lösliche Antigene. Diese Antigene werden aufgenommen und prozessiert. Die dabei entstehenden Peptidfragmente werden über MHC II-Moleküle präsentiert und von T-Zellen erkannt. B-Zellen exprimieren viele MHC II-Moleküle, haben aber keine konstitutive kostimulatorische Aktivität. Durch die Stimulation mit mikrobiellen Bestandteilen wie z.B. LPS wird die Expression kostimulatorisch wirksamer Oberflächenmoleküle induziert. Dennoch ist nicht genau geklärt, ob B-Zellen wirklich in der Lage sind T-Zellen zu aktivieren.

1.1.3 Die Interaktion zwischen T-Lymphozyt und APZ

Die Wanderung naiver T-Zellen zu den T-Zonen des Lymphknotens und die erste Interaktion mit einer APZ werden durch Adhäsionsmoleküle gesteuert. Auf der T-Zelle werden die Adhäsionsmoleküle LFA-1 und CD2 exprimiert auf der APZ sind die entsprechenden Moleküle ICAM-1,-2 und -3 und LFA-3 (Dustin 1991). Die T-Zelle prüft während des Adhäsionsprozesses die MHC-Moleküle auf das Vorhandensein ihres spezifischen Peptides. Wenn es zu einer TZR-MHC-Ligation kommt, induziert dies eine Konformationsänderung von LFA-1, die dessen Affinität zu den Adhäsionsmolekülen ICAM-1,-2 und -3 erhöht (Moingeon 1991). Dieser Vorgang stabilisiert die Bindung zwischen den beiden Zellen und ermöglicht es, daß die Assoziation mehrere Tage bestehen bleibt. In dieser Zeit kann die naive T-Zelle mit Hilfe eines kostimulatorischen Signals der APZ proliferieren und ihre Tochterzellen können sich zu Effektorzellen differenzieren.

Wenn die Differenzierung der T-Zelle abgeschlossen ist, verläßt die Zelle das lymphatische Gewebe und gelangt ins Blut. Von dort kann sie in die Organe wandern. Die Migration der T-Lymphozyten an den Ort einer Infektion wird durch die von Endothelzellen im Zuge eines entzündlichen Vorganges exprimierten Adhäsionsmoleküle unterstützt (Dustin 1991). Die T-Effektorzelle bindet mit Hilfe ihrer Oberflächenmoleküle CD2 und LFA-1 an ihre potentiellen Zielzellen am Ort der Entzündung, bis sie die Zelle gefunden hat, die ihr spezifisches Antigen präsentiert. Dann kommt es wiederum zu einer Konformationsänderung von LFA-1 und die Bindung wird stabilisiert. Die Ligation des TZR führt zur Freisetzung von Effektormolekülen und zu einer Polarisation des Zytoskeletts der T-Zelle. Durch die Polarisation werden die Effektormoleküle auf engem Raum konzentriert und auf die antigentragende Zielzelle gerichtet freigesetzt. Die Wirkung der T-Effektorzellen entfaltet sich in unterschiedlicher Weise. Die T-Effektorzellen können lösliche Mediatoren freisetzen wie z.B. Zytotoxine, die vorallem von CD8-T-Zellen stammen, und Zytokine, die sowohl von CD4-T-Zellen als auch von CD8-T-Zellen produziert werden und sie exprimieren membrangebundene Moleküle wie Fas-Ligand oder CD40-Ligand.

1.1.4 Die Differenzierung von T_H1- und T_H2-Zellen

Bei den Zellen des T_H1- oder T_H2-Typs, handelt es sich um CD4-T-Zellen, die ein unterschiedliches Repertoire an Zytokinen produzieren. Als T_H1-Zellen bezeichnet man

inflammatorische Zellen, die bevorzugt die Zytokine Interferon gamma ($IFN\gamma$) und IL-2 sezernieren. Ihre Aktivierung führt zu einer zellvermittelten Immunität. Die T_H2 -Zellen produzieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 (Muraille 1998, Mosmann 1996, Reiner 1995). Überwiegen T_H2 -Zellen im Verlauf einer Immunreaktion führt dies zu einer humoral geprägten Immunantwort.

Für gewisse Krankheitsbilder wie z.B. Allergien und Wurminfektionen ist eine T_H2 -Immunantwort charakteristisch, auf andere Krankheitserreger reagiert das Immunsystem mit einer T_H1 -Immunantwort, dazu zählen viele intrazelluläre Parasiten. Wenn das Immunsystem auf eine Infektion inadäquat reagiert, d.h. anstelle einer T_H1 -Antwort eine T_H2 -Antwort ausbildet oder umgekehrt, führt dies zu längeren und schweren Krankheitsverläufen. Ein Beispiel dafür ist die T_H2 -Antwort der lepromatösen Form der Lepra, die im Gegensatz zu der T_H1 -dominierten tuberkuloiden Form zu entstellenden und ulzerierenden Hauterscheinungen führt, da die Antikörper, die durch die T-Helferzellen induziert werden, die intrazellulären Bakterien nicht erreichen können. Ein weiteres Beispiel ist das Leishmanieninfektionsmodell der Maus. Bei Mäusen, die eine T_H1 -Immunantwort ausbilden, findet man weniger Parasiten als bei Mäusen, die mit einer T_H2 -Immunantwort reagieren. Durch Konversion der T_H2 -Antwort in eine T_H1 -Antwort kann eine Reduktion der Parasitenzahl erreicht werden (Sypek 1993).

Die Differenzierung von CD4-T-Zellen in Zellen des T_H1 - oder T_H2 -Typs wird von mehreren Faktoren beeinflusst, die z.T. noch nicht völlig geklärt sind. Eine wichtige Rolle bei diesem Differenzierungsvorgang spielen die Zytokine, die während der ersten Reaktion einer naiven CD4-T-Zelle mit dem Antigen anwesend sind.

Die Anwesenheit von IL-12 und $IFN\gamma$, die von Makrophagen und NK-Zellen gebildet werden, unterstützt die Ausbildung einer T_H1 -Immunantwort (Muraille 1998, Wu 1993, Manetti 1993). Die Bedeutung dieser beiden Zytokine wurde in vivo und in vitro gezeigt. C3H/HeN Mäuse sind gegen Leishmanieninfektionen resistent, da sie bevorzugt einen T_H1 -Phänotyp ausbilden. Die Neutralisation von $IFN\gamma$ in C3H/HeN Mäusen, die unter einer Leishmanieninfektion leiden, führt zu einem Fortschreiten der Infektion, da die Mäuse nicht mehr in der Lage sind die kurative T_H1 -Antwort auszubilden (Belosevic 1989). Ein weiteres Zytokin, das bei der Differenzierung von T-Lymphozyten in T_H1 -Zellen eine Rolle spielt, ist $IFN\alpha$ (Rogge 1998). $IFN\alpha$ wird von DZ und von Zellen, die von Viren infiziert sind, synthetisiert (Siegal 1999, Biron 1998).

Für die Ausbildung einer T_H2 -Immunantwort sind die Zytokine IL-4 und IL-10 wichtig (Seder 1992, Schmitt 1994). Diese Zytokine werden von T_H2 -Zellen synthetisiert und fördern im Sinne einer positiven Rückkopplung die T_H2 -Differenzierung.

Die Vorstellung, daß das Immunsystem entweder im Sinne einer T_H1 - oder einer T_H2 -Antwort reagiert, ist stark vereinfacht. Vielmehr handelt es sich wahrscheinlich um zwei sich gegenseitig kontrollierende Systeme, in denen IL-10 eine Schlüsselrolle spielt (Muraille 1998).

Ein weiterer Faktor, der für die Differenzierung der CD4-T-Zellen bedeutend ist, ist die Dichte der Antigene auf der Oberfläche der APZ. Eine hohe Dichte des Antigens auf der Zelloberfläche fördert die Ausbildung einer T_H1 -Antwort, während eine niedrige Antigenkonzentration eine T_H2 -Antwort hervorruft (Rogers 1998).

1.1.5 Herkunft und Funktion der Zytokine

Zytokine sind lösliche Faktoren, die von unterschiedlichen Zellen gebildet werden und ihre Wirkung abhängig von der Art der Zielzelle durch Bindung an einen Zytokinrezeptor entfalten. Sie können autokrin, parakrin oder endokrin wirken. In der folgenden Tabelle sind einige wichtige Zytokine sowie ihre Herkunft und die Funktion bezogen auf ihre Zielzellen zusammengefaßt (modifiziert nach Janeway/Travers: Immunology 1997, 2. Auflage):

		Wirkung auf				
Zytokin	synthetisierende Zellen	B-Zellen	T-Zellen	NK-Zellen	Makrophagen	andere Zellen
Interleukin-2 (IL-2)	T_H1 , CTL	Wachstum	Wachstum	Wachstum		
Interferon γ (IFNγ)	T_H1 , CTL, NK-Zellen	Differenzierung, IgG2a-Synthese		Aktivierung	Aktivierung, \uparrow MHC-I und MHC-II	antiviral, \uparrow MHC I und MHC II
Interleukin-4 (IL-4)	T_H2	Aktivierung, Wachstum, \uparrow MHC I und MHC II, IgE-Antwort	Wachstum, Überleben, Differenzierung zu T_H2		Inhibition der Makrophagenaktivierung	

Interleukin-5 (IL-5)	T _H 2	Differenzierung IgA-Synthese				
Interleukin-10 (IL-10)	T _H 2	↑ MHC II	Inhibition von T _H 1		Inhibition der Zytokinfrei- setzung	
Interleukin-12 (IL-12)	Makrophagen, B-Zellen		Differen- zierung zu T _H 1	Aktivierung, IFN γ - Synthese		
Interleukin-18 (IL-18)	Makrophagen		IFN γ - Synthese	Aktivierung, IFN γ - Synthese		
Interferon a (IFNα)	Leukozyten, v.a. dendri- tische Zellen		Differen- zierung zu T _H 1			antiviral, ↑ MHC I
Interferon b (IFNβ)	Fibroblasten					antiviral, ↑ MHC I

1.2 Bakterielle DNA und synthetische CpG-Oligodeoxynukleotide (ODN) als Aktivatoren von Immunzellen

Hinweise für immunstimulatorische Wirkungen von „Fremd“-DNA gibt es seit den 60er Jahren (Jensen 1963). Beschrieben wurde sowohl die Induktion der Produktion von IFN γ , als auch die Aktivierung von NK-Zellen, sowie Induktion einer antitumoralen Aktivität durch Fraktionen des Bacillus Calmette-Guerin (BCG) (Tokunaga 1984, Yamamoto 1988, Mashiba 1990). Die immunstimulierende Aktivität dieser Fraktion konnte durch Vorinkubation mit DNAsen, nicht aber mit RNAsen zerstört werden. Dies legte den Schluß nahe, daß die bakterielle DNA den immunstimulierenden Anteil der BCG-Fraktion ausmacht. Die genaue Untersuchung der immunologisch aktiven DNA-Sequenzen ergab, daß es sich dabei um Oligonukleotide handelt, die aus einem zentralen Palindrom mit einem CpG-Motiv bestehen (Yamamoto¹ 1992, Yamamoto² 1992). Weitere Untersuchungen gaben Anlaß zu der Hypothese, daß sich das für die immunstimulatorische Wirkung wichtige Motiv aus einer zentralen CpG-Gruppe zusammensetzt, die am 5'-Ende von zwei Purinen und am 3'-Ende von zwei Pyrimidinen flankiert wird (Krieg 1995). CpG-Dinukleotide werden in eukaryonter DNA supprimiert. Einerseits kommen diese Motive in eukaryonter DNA nur mit einem

Fünftel der erwarteten Frequenz vor, andererseits sind sie zu 60-90 % methyliert (Bird 1986). Im Gegensatz dazu findet man das CpG-Motiv in bakterieller DNA unmethyliert und mit der erwarteten Frequenz (1:16). Es konnte gezeigt werden, daß die Methylierung das stimulatorische Potential des CpG-Motivs zerstört (Krieg 1995). Diese Unterschiede zwischen bakterieller und eukaryonter DNA ermöglichen es, die biologischen Beobachtungen bezüglich der immunstimulatorischen Wirkung von bakterieller DNA und CpG-ODN sinnvoll zu interpretieren. Die Erkennung von „Fremd“-DNA und die darauf folgende immunologische Reaktion ist für das angeborene Immunsystem eine Möglichkeit zwischen „Selbst“ und „Fremd“ zu unterscheiden, ohne auf Vermittlung und Intervention des adaptiven Immunsystems angewiesen zu sein. Diese Wirkung und Funktion der „Fremd“-DNA ist vergleichbar mit der von LPS, Peptid G und Lipoteichonsäure (LTA) (English 1996, Greenberg 1996, De Kimpe 1995). Auch von doppelsträngiger RNA, die im vertebralem Immunsystem als „Fremd“ erkannt wird, sind immunstimulatorische Wirkungen bekannt (Cella 1999, Taborsky 1977).

1.2.1 Immunstimulatorische Wirkung von ODN im murinen Immunsystem

Die Effekte und der Wirkungsmechanismus der CpG-ODN wurden vor allem im murinen System untersucht. ODN wirken sowohl auf das angeborene als auch auf das adaptive Immunsystem der Maus stimulatorisch, wobei sich die Wirkungen im Bezug auf die Signalübertragung und die Sequenzspezifität unterscheiden.

1.2.1.1 Wirkung der CpG-ODN auf APZ

Es konnte gezeigt werden, daß CpG-ODN auf die unterschiedlichen Typen von APZ immunstimulatorisch wirken.

Die Stimulation von gereinigten B-Lymphozyten mit unmethylierten CpG-ODN führt zur Proliferation und Sekretion von Immunglobulinen (Krieg 1995).

CpG-ODN induzieren in Makrophagen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor κ B (NF- κ B), die Transkription von Zytokin-mRNA (Stacey 1996) und die Sekretion von Zytokinen wie TNF α , IL-1, IL-6 und IL-12 (Sparwasser 1997, Lipford² 1997). Ferner

konnte durch bakterielle DNA und CpG-ODN eine Induktion der NK-Zellaktivität gemessen werden (Yamamoto¹ 1992). Hierbei handelt es sich um einen indirekten CpG-Effekt, da gezeigt werden konnte, daß die Induktion dieser NK-Zellaktivität die Anwesenheit akzessorischer Zellen braucht und durch IL-12, IFN α/β und TNF α vermittelt wird (Ballas 1996, Tokunaga 1992).

CpG-ODN wirken sowohl auf reife als auch auf unreife DZ aktivierend. Sie verstärken auf beiden Zellpopulationen die MHC II-Expression und die Expression von kostimulatorischen Molekülen (CD40, CD86) und induzieren die Produktion von Zytokinen wie IL-6, IL-12 und TNF α (Sparwasser 1998).

Um den Wirkmechanismus der CpG-ODN näher zu untersuchen, wurden Versuche mit immobilisierten CpG-ODN durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche weisen daraufhin, daß eine Aufnahme der CpG-ODN in die Zelle für die immunstimulatorische Wirkung notwendig ist (Krieg 1995). Andere Versuche zeigen, daß die Aufnahme der DNA an der Zelloberfläche von Makrophagen durch jedes beliebige kompetitiv zugegebene ODN blockiert werden kann (Häcker 1998), was die Schlußfolgerung nahelegt, daß die Aufnahme der ODN in die Zelle nicht sequenzspezifisch erfolgt. Dagegen könnte die CpG-Spezifität durch einen intrazellulären Rezeptor, der z.B. im Endosom lokalisiert ist, vermittelt werden. Die Hypothese der endosomalen Lokalisation eines intrazellulären CpG-Rezeptors wird durch Ergebnisse untermauert, die zeigen, daß die endosomale Ansäuerung für den Signalweg der CpG-ODN notwendig ist, da die CpG-ODN-Wirkung durch Inhibitoren der endosomalen Ansäuerung wie z.B. Chloroquin blockiert wird (Macfarlane 1998, Yi 1998, Häcker 1998). Der vollständige Wirkmechanismus und Signalweg der CpG-ODN ist jedoch größtenteils noch ungeklärt.

1.2.1.2 Wirkung der CpG-ODN auf T-Lymphozyten

CpG-ODN entfalten ihre Wirkung auf Makrophagen und DZ direkt, während die CpG-ODN-Wirkung auf die B-Zellen sowohl direkt als auch im Sinne einer Kostimulation möglich ist (Krieg 1995). Dagegen konnten direkte Wirkungen von CpG-ODN auf T-Zellen nicht gezeigt werden (Lipford¹ 1997). Jedoch werden T-Zellen, die über eine TZR-Ligation ihr Signal 1 erhalten, durch CpG-ODN kostimuliert (Bendigs 1999). Diese Kostimulation ist CD28-unabhängig und geht mit einer gesteigerten IL-2-Produktion und vermehrter Expression des IL-2-Rezeptors einher. Die kostimulatorische Aktivität der ODN ist nicht strikt CpG-abhängig

und die Wirkung der ODN kann durch Chloroquin nicht gehemmt werden (Lipford unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß der Mechanismus der T-Zellkostimulation ein anderer ist als der einer direkten CpG-ODN-Wirkung auf APZ.

Die Untersuchungen der direkten Wirkung von ODN auf T-Zellen wurden in vitro durchgeführt. Es liegen allerdings viele in vivo-Ergebnisse vor, in denen CpG-ODN als Adjuvans verwendet wurden, und durch die Injektion von CpG-ODN in vivo eine T-Zellaktivierung induziert wurde. Die CpG-ODN unterstützen die Ausbildung einer T_H1 -Immunantwort und induzieren eine starke peptidspezifische zytotoxische T-Lymphozytenaktivität (ZTL) (Lipford¹ 1997, Roman 1997, Weiner 1997). Diese in vivo-Experimente erlauben allerdings keine Aussagen darüber, inwieweit die T-Zellaktivierung auf direkte kostimulatorische oder indirekte Effekte der CpG-ODN zurückzuführen ist.

1.2.2 Immunstimulatorische Wirkung von ODN im humanen Immunsystem

Im Gegensatz zum murinen System liegen für die Wirkung von ODN im humanen System nur wenige Befunde vor. Es ist bekannt, daß ODN mit CpG-Motiven in Lymphozyten aus dem peripheren Blut die Produktion von $IFN\alpha$ induzieren (Yamamoto 1994, Roman 1997). Ferner ist gezeigt, daß durch CpG-ODN - ähnlich wie im murinen System - NK-Zellen durch die Vermittlung von IL-12, das von aktivierten Makrophagen produziert wird, aktiviert werden (Ballas 1996). Humane periphere mononukleäre Zellen (Peripherblut monocytische Zellen = PBMZ) werden durch CpG-ODN sequenzspezifisch aktiviert. Diese Aktivierung führt zu einer erhöhten Expression von CD86, CD40, MHC I- und MHC II-Molekülen und zu einer Produktion der Zytokine IL-12, IL-6 und $TNF\alpha$. Wie im murinen System induzieren CpG-ODN die Proliferation humaner B-Zellen (Bauer 1999). Die bisher gewonnenen Ergebnisse im humanen System weisen viele Gemeinsamkeiten mit den Ergebnissen im murinen System auf.

Es bleibt noch zu untersuchen, ob die ODN-Effekte auf murine T-Lymphozyten analog auch im humanen System gezeigt werden können.

2 Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollen die Effekte synthetischer ODN auf humane T-Lymphozyten *in vitro* unter Einbeziehung der Proliferation, der Zytokinproduktion und der Expression von Oberflächenantigenen untersucht werden.

Der erste Teil der Arbeit soll die direkten Effekten der ODN auf gereinigte humane T-Zellen untersuchen. Zu diesem Zweck soll ein System entwickelt werden, in dem die T-Zellen durch immobilisiertes anti human CD3 ein Signal 1 erhalten und die in löslicher Form zugegebenen ODN als möglicher Kostimulus dienen. Die eventuelle Aktivierung der mit anti human CD3 und ODN stimulierten T-Zellen soll anhand der Proliferation, der Zytokinausschüttung und der Expression von Oberflächenmolekülen quantifiziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen die indirekten Effekte von ODN auf humane T-Lymphozyten, die sich in einem PBMZ-Verband befinden, untersucht werden. Der Versuchsaufbau wird so konzipiert sein, daß durch Zugabe von löslichem anti human CD3 eine TZR-Ligation stattfindet und die Zugabe von CpG-ODN zu einer Aktivierung der B-Zellen und APZ führt. Die indirekten Effekte auf die T-Zellen werden anhand der Expression von Oberflächenmolekülen und der Produktion von Zytokinen gemessen werden. Zur weiteren Charakterisierung eventuell vorhandener indirekter Effekte sollen Transwell-Systeme, Überstandstransfer, neutralisierende Antikörper und rekombinante Zytokine eingesetzt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

3.1.1 Zellkulturmedium zur Kultivierung primärer Zellen

Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 (Biochrom, Seromed, Berlin) mit folgenden Zusätzen verwendet:

Bezeichnung	Herkunft	Konzentration
Hydroxyethylpiperazinethanolsulfonsäure (HEPES) Puffer	Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland	2.4 g/l
Bicarbonat	Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland	1.2 g/l
Penicillin G	Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland	60 µg
Tylosintartrat	Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland	10 µg/ml
Streptomycinsulfat	Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland	125 µg/ml
L-Glutamin	Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland	10 mM
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	50 µM
Fötale Kälberserum (FKS)	Vitromex, Selters, Deutschland	10 % (v/v)

Das Kulturmedium wurde steril filtriert (0.22 µm Filter, Sartorius, Göttingen, Deutschland) und bei 4 °C gelagert.

3.1.2 Eosin Färbelösung

2 g Eosin (Merck, Darmstadt, Deutschland), 250 mg Natriumazid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 50 ml FKS wurden langsam in 450 ml 0.9 % Natriumchlorid Lösung eingerührt, durch ein Filterpapier filtriert, portioniert und bei 4 °C gelagert. Diese Lösung diente zur Vitalfärbung von Zellsuspensionen in Verhältnissen zwischen 10:1 bis 1:1.

3.1.3 Paraformaldehyd-Fixierlösung (PFA)

1 g Paraformaldehyd (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde in 100 ml PBS bei 56 °C unter Rühren über Nacht gelöst. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0.45 µm Filter filtriert und bei 4 °C gelagert.

3.1.4 Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

Phosphat gepufferte Salzlösung (Instantmix) enthält 4 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl und 20 mM KCl (pH 7,2) und wurde von Biochrom, Seromed (Berlin, Deutschland) bezogen. Zusätzlich wurden Antibiotika wie unter 2.1.1 beschrieben zugegeben. Nach steriler Filtration erfolgte die Lagerung bei 4 °C.

3.1.5 Zytokine

3.1.5.1 IL-2

Humanes rekombinantes IL-2 (Eurocetus, Amsterdam, Niederlande) wurde als Wachstumsfaktor für Lymphozytenkulturen in einer Mediumkonzentration von 10 - 100 U/ ml eingesetzt.

Lagerung: Stammlösung 30 000 U/ ml, steril filtriert (0.22 µm Filter, Gelman Sciences, Michigan, USA), -20 °C

Arbeitslösung 1000 U/ ml, steril filtriert, 4 °C

3.1.5.2 IL-12

Humanes rekombinantes IL-12 (Pharmingen, San Diego, CA, USA) wurde zur Stimulation von PBMZ in einer Mediumkonzentration von 2 ng/ ml eingesetzt.

Lagerung: Arbeitslösung 10 ng/ µl, steril filtriert, -20 °C

3.1.5.3 IFN α

Humanes rekombinantes IFN α (PBL, New Brunswick, NJ, USA) wurde zur Stimulation von PBMZ und T-Lymphozyten in einer Mediumkonzentration von 5000 U/ ml eingesetzt.

Lagerung: Stammlösung 1×10^6 U/ ml, steril filtriert, -70 °C

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 T-Lymphozyten stimulierende Antikörper

Folgende Antikörper wurden zur Stimulation von T-Lymphozyten verwendet:

Bezeichnung	Klon	Herkunft
Maus anti human CD3	UCHT1	Immunotech, Marseilles, Frankreich
Maus anti human CD28	CD28.2	Immunotech, Marseilles, Frankreich
Maus anti human $\alpha\beta$ TZR	T10B9.1A-31	Pharmingen, San Diego, CA, USA

3.1.6.2 Zytokin neutralisierende Antikörper

Folgende Antikörper wurden zur Neutralisation von Zytokinen verwendet:

Bezeichnung	Isotyp	Konzentration	Herkunft
Maus anti human IL-12 (p40/ p70)	IgG1	2 μ g/ ml	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Kaninchen anti human IFN α	polyklonales Serum	500 U/ ml	PBL, New Brunswick, NJ, USA

3.1.7 ODN

Alle verwendeten Oligodeoxynukleotide waren einzelsträngig und wurden von TibMolBiol (Berlin, Deutschland) bezogen. Wenn nicht anders vermerkt, so handelte es sich um phosphorothioatstabilisierte ODN, die in einer Mediumkonzentration von 2 µM eingesetzt wurden. Phosphorothioatmodifizierte ODN sind resistenter gegen den Abbau durch DNAsen (Stein 1988).

Lagerung: Die lyophilisierten ODN wurden in Ultra-Pure Water (Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland) gelöst, auf die Konzentration von 250 µM verdünnt, steril filtriert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Folgende ODN wurden verwendet:

Name	Sequenz
2006	5' - TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT - 3'
2006K	5' - TGC TGC TTT TGT GCT TTT GTG CTT - 3'
DSP30	5' - TCG TCG CTG TCT CCG CTT CTT CTT GCC - 3'
DSP30K	5' - TGC TGC CTG TCT CGC CTT CTT CTT GCC - 3'
1628	5' - GGG GTC AAC GTT GAG GGG GG - 3'
1668	5' - TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT - 3'
Oligo-A	5' - AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA - 3'
Oligo-G	5' - GGG GGG GGG GGG GGG GGG GG - 3'
Oligo-T	5' - TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT - 3'
Oligo-C	5' - CCC CCC CCC CCC CCC CCC CC - 3'
GR1	5' - TTG GAG GGG GTG GTG GGG - 3'
PZ1	5' - CTC CTA GCG GGG GCG TCC TAT - 3'
PZ2	5' - CTC CTA GTG GGG GTG TCC TAT - 3'
PZ3	5' - CTC CTA TTG GGG GTT TCC TAT - 3'
PZ4	5' - CTC CTA GTG GTT GTG TCC TAT - 3'
PZ5	5' - CTC CTA GTT GTT TTG TCC TAT - 3'
AP1	5' - GCT TGA TGA CTC AGC CGG AA - 3'

3.2 Zellisolation und -kultivierung

3.2.1 Zellisolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut durch Dichtegradientenzentrifugation

Zur Abtrennung der mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) von Erythrozyten und Granulozyten wurde heparinisiertes Blut einer Dichtegradientenzentrifugation über einen diskontinuierlichen Ficollgradienten unterzogen (Referenz: Current Protocols in Immunology 1996). Dabei sammeln sich die mononukleären Zellen in der Interphase, während Erythrozyten und Granulozyten auf Grund ihrer höheren Dichte pelletieren.

„Buffy Coats“ freundlicherweise vom Blutdepot des Klinikums Rechts der Isar zu Verfügung gestellt bzw. heparinisertes venöses Blut gesunder Spender wurde mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt und mit Ficoll-Hypaque Lösung der Dichte 1.077 g/ ml (Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland) unterschichtet, wobei für 10 ml Blut/ PBS-Lösung 3 ml Ficoll-Hypaque Lösung eingesetzt wurden. Nach Zentrifugation dieser Lösung (1000x g, Raumtemperatur (RT), 30 min) wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Interphase über der Ficoll-Hypaque Lösung wurde vorsichtig gewonnen und viermal mit Hanks Balanced Salt Lösung (HBSS) (Biochrom, Seromed, Berlin, Deutschland) gewaschen. Die resultierende Zellsuspension wurde durchflußzytometrisch auf den Gehalt von Thrombozyten überprüft und gegebenenfalls nochmals gewaschen. Anschließend wurde die Zellkonzentration durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.2.2 Isolation von T-Lymphozyten

3.2.2.1 Isolation von T-Lymphozyten aus PBMZ

Für die Aufreinigung von T-Lymphozyten aus PBMZ wurde ein Selektionskit der Firma Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers verwendet, mit dem T-Zellen nach dem Prinzip der Negativselektion aus den PBMZ gewonnen werden können.

Das Prinzip der Negativselektion beruht darauf, daß im ersten Schritt die B-Zellen, APZ und NK-Zellen mittels eines Hapten-Antikörpercocktails markiert werden. Der im zweiten Schritt

eingesetzte magnetisch markierte Anti-Hapten-Antikörper ermöglicht das Zurückhalten dieser Zellen in einem Magnetfeld, während die T-Zellen das Magnetfeld ungehindert passieren können. Im so gewonnenen Eluat finden sich nur noch T-Zellen. Die durchflußzytometrisch Überprüfung des Eluats ergab einen prozentualen T-Lymphozytenanteil, von mindestens 95 % (siehe Abb. 1).

3.2.2.2 Isolation von T-Lymphozyten aus Tonsillen

Kleine Gewebestücke aus Tonsillen wurden mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Maschennetz gedrückt und die so gewonnene Einzelzellsuspension über Ficoll-Hypaque Zentrifugation von festen Bestandteilen und toten Zellen gereinigt (siehe 3.2.1). Für die weitere Aufreinigung von T-Lymphozyten siehe 3.2.2.1.

3.2.3 Zellkultivierung

Die Kultivierung der T-Zellen und PBMZ erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C mit 5 % CO₂. T-Lymphozyten wurden, wenn in der Versuchsdurchführung nicht anderweitig erwähnt in 96-well-Platten (Falcon, Heidelberg, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 200 µl/ well, PBMZ in 24-well-Platten (Falcon, Heidelberg, Deutschland) in 1 ml/ well kultiviert.

3.2.4 Stimulation von gereinigten T-Lymphozyten mit immobilisierten Antikörpern

Die unter 3.1.6.1 genannten Antikörper wurden in Konzentrationen von 0.2 - 4 µg/ ml eingesetzt. Bei Stimulation der Zellen mit anti human CD28 in Kombination mit anti human CD3 oder anti human $\alpha\beta$ TZR erfolgte die Immobilisation der Antikörper simultan. Es wurden folgende Volumina der Antikörperlösungen eingesetzt: 50 µl/ well für 96-well-U- oder F-Bodenplatten und 250 µl/ well für 24-well-Platten. Die Platten wurden für 12 - 16 h bei 4 °C inkubiert. Nach dem Absaugen der Antikörperlösung und zweimaligem Waschen mit PBS, wurden die Platten mit 200 µl Medium (10 % FKS) für 2 h bei 4 °C gesättigt. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen in entsprechenden Konzentrationen und Volumina auf die Platten pipettiert.

3.2.5 Kultivierung von T-Zellblasten

Zur Generierung von T-Zellblasten aus ruhenden humanen T-Zellen wurden 2×10^6 T-Zellen/well in 24-well-Platten mit $1 \mu\text{g/ml}$ immobilisiertem anti human CD3 stimuliert (siehe 3.2.4). Nach 3 Tagen wurden die Zellen gewaschen und bis zur weiteren Verwendung mit 10 U/ml IL-2 in einem Volumen von 40 ml in Zellkulturflaschen (Falcon, Heidelberg, Deutschland) für mindestens 5 Tage kultiviert. 24 h vor Beginn des eigentlichen Experiments wurden die T-Zellblasten nach dreimaligem Waschen in IL-2-freies Zellkulturmedium transferiert.

3.2.6 Stimulation von gereinigten T-Lymphozyten im Transwell-System

Um die beiden Mechanismen der T-Zellaktivierung durch APZ durch Zell-Zell-Kontakt oder durch lösliche Faktoren, von einander abzugrenzen wurden Kulturplatteneinsätze mit einer $0.2 \mu\text{m}$ Anopore Membran (Nunc, Roskilde, Dänemark) verwendet. Diese Membran ermöglicht auf Grund der Porengröße einen Konzentrationsausgleich von löslichen Substanzen, zum Beispiel Zytokinen, während die beiden Zellkulturen voneinander getrennt bleiben. In 24-well-Platten mit immobilisierten anti human CD3 (siehe 3.2.4) wurden $500 \mu\text{l}$ einer T-Zellsuspension ($6 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml) pipettiert. Nach Positionierung der Kulturplatteneinsätze in diese 24-well-Platten wurden $500 \mu\text{l}$ mit 5×10^6 PBMZ in die Einsätze transferiert. Die Isolation der T-Lymphozyten und der PBMZ erfolgte aus identischen Eigenblutspenden.

3.3 Methoden

3.3.1 Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Proliferation von T-Zellkulturen wurde ein [^3H] Thymidin-Inkorporationsassay eingesetzt.

T-Lymphozyten wurden in 96-well-U- oder F-Bodenplatten unter Zugabe unterschiedlicher Stimuli kultiviert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Kulturen wurde nach 3 - 6 Tagen $1 \mu\text{Ci}$ ($6,7 \text{ Ci/mM}$) [^3H] Thymidin zugegeben. Nach 8 h wurden die Zellsuspensionen mit einem 96-well Zellharvester (Inotech, Schweiz) durch einen Glasfaserfilter gesaugt, der die hochmolekulare chromosomale DNA zurückhält. Die am Filter absorbierte β -Aktivität als

Ausdruck der [³H] Thymidininkorporation in die DNA und damit der proliferativen Aktivität der Zellen wurde mit einem Matrix-96 Counter (Packard Instruments, Meriden, CT, USA) in counts per minute (cpm) gemessen. Mittelwerte und Standardabweichung wurden aus Vierfachbestimmungen errechnet.

3.3.2 Messung der Zytokinproduktion

3.3.2.1 Elisa (Enzyme linked immuno sorbend assay)

Die Konzentrationen folgender Zytokine in Kulturüberständen wurden mittels Elisa nach Angaben der Hersteller bestimmt: IL-2, IFN γ (PharMingen, San Diego, CA, USA) und IFN α (Multi-Species ELISA Kit) (PBL, New Brunswick, NJ, USA).

Der Zytokinnachweis erfolgt mit Hilfe eines immobilisiertem „Capture-Antikörpers“, an den das in den Überständen vorhandene Zytokin bindet. Das gebundene Zytokin wird mittels eines zweiten „Detection-Antikörpers“, der biotinmarkiert ist, nachgewiesen. Der Biotinanteil des zweiten Antikörpers bindet an die zugegebene Streptavidin-Peroxidase (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), die nach Zugabe einer Substratlösung zu einem Farbumschlag führt, der photometrisch gemessen werden kann. Um die Zytokinkonzentration quantitativ zu bestimmen, erstellt man parallel zu den Überstandmessungen eine Standardkurve unter Einsatz bekannter Zytokinkonzentrationen.

Zum Waschen wurde PBS mit 0.05 % Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate (Tween 20) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und als Substratlösung o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (ODP) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verwendet. Die Messung der Extinktion erfolgte am Elisa-Reader bei 490 nm (Referenzwellenlänge 650 nm).

3.3.2.2 Intrazelluläre Färbungen

Puffer

Als Färbelösung wurde PBS mit 0.5 % (g/ v) Saponin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 0.05 % (g/ v) Natriumazid (Schuhardt, Hohenbrunn, Deutschland) und 0.5 % BSA verwendet. Der Zusatz von Saponin diente der Perforation der Zellmembran, um so die Diffusion der Antikörper ins Zytoplasma zu ermöglichen.

Methode

Die Identifikation der IFN γ -produzierenden Zellen erfolgte durch simultane Färbungen mit Antikörpern gegen Zelldifferenzierungsmarker und intrazelluläres IFN γ . PBMZ (5×10^6 / ml) wurden bei 37 °C in 24-well-Platten unter Zugabe unterschiedlicher Stimuli inkubiert. Nach 4 – 8 h erfolgte die Zugabe von 5 μ g/ ml Brefeldin A (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), das durch Hemmung des Golgiapparats den Export der Zytokine aus den Zellen verhindert. Nach 12 stündiger Inkubation mit Brefeldin A wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 % Formaldehydlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 10 min bei RT fixiert. Auf einen erneuten Waschschrift folgte die Inkubation der Zellen für 10 min bei RT in 50 μ l Puffer mit folgenden Antikörpervolumina:

1. 1 μ l des Phycoerythrin (PE) markierten anti human IFN γ (Pharmingen, San Diego, CA, USA)
2. 3 μ l des entsprechenden fluoreszeinisothiocyanat (FITC)- oder biotinmarkierten Antikörpers gegen einen T-Zell- oder NK-Zelldifferenzierungsmarker (anti human CD4, anti human CD8 ect., siehe 3.3.3.1)

Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Puffer gewaschen. Bei Verwendung von biotinmarkierten Antikörpern wurden diese mit 2.5 μ l Streptavidin-Peridininchlorophyllprotein-Konjugaten in 50 μ l Puffer gegengefärbt und nochmals gewaschen.

Wurden als Zelldifferenzierungsmarker CD16, CD19 oder CD56 gefärbt, so erfolgte dies vor Fixierung der Zellen mit Formaldehyd.

Die gefärbten Zellen wurden mit Hilfe eines Durchflußzytometers (Coulter EPICS XL) analysiert.

3.3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

RNA-Isolation

2×10^6 T-Zellblasten wurden mit Überständen von PBMZ, die über Nacht mit ODN, ODN mit anti human CD3 oder Medium stimuliert worden waren, für 4 h kultiviert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 0.5 ml TriFast (Peqlab, Erlangen, Deutschland) lysiert und 5 min bei RT inkubiert. Der Suspension wurde 0.1 ml Chloroform (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zugegeben. Nach Inkubation (5 min, RT) erfolgte die Zentrifugation (12000x g, 15 min, 4 °C) zur Phasentrennung. Die wässrige Phase wurde abgenommen die RNA mit 0.5

ml Isopropanol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefällt (10 min, RT) und durch Zentrifugieren pelletiert (12000x g, 10 min, 4 °C). Nach einem Waschschriff mit 75% Ethanol wurde das RNA-Pellet 5 min luftgetrocknet. Die RNA wurde in 30 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -70 °C gelagert.

cDNA-Synthese

Zur Transkription der RNA in cDNA wurden alle Reagentien von Perkin-Elmer (Foster City, CA, USA) bezogen. 5 µl RNA (entsprechen etwa 500 ng) wurden mit 2.5 µl random Primer (50µM), 5 µl Puffer (KCl 500 mM, TrisHCl 100 mM), 11 µl MgCl₂ (25 mM), 10 µl dNTP (10 mM), 1 µl RNase Inhibitor (20 U/ µl), 0.5 µl reverse Transkriptase (50 U/ µl) und 15 µl Wasser für 10 min bei 25 °C inkubiert. Darauf folgten Inkubationsschritte von 30 min bei 48 °C und 5 min bei 95 °C. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Realtime TaqMan PCR

Während bei konventioneller PCR Nachweis und Mengenabschätzung der Zielsequenz durch Gelelektrophorese des PCR-Produkts erfolgen, macht man sich bei der Taqman PCR die Spaltung fluorogener Sonden (Taqman Probes) durch 5'3'Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zunutze (Holland 1991). TaqMan Sonden sind am 5'Ende mit einem Reporter- und am 3'Ende mit einem Quentcherfarbstoff markiert. Ihre Sequenz wird so gewählt, daß sie als „internal probes“ zwischen den beiden PCR Primern an die Zielsequenz binden. Die Spaltung der TaqMan Sonde durch die 5'3'Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase verhindert das Quentching und führt zu einem Anstieg Fluoreszenz. Durch kontinuierliche Detektion der Fluoreszenzintensität von Reporter- und Quentcherfarbstoff während der einzelnen PCR-Zyklen, läßt sich der Threshold-Cycle (CT) als der Zyklus betimmen, bei dem die Reporterfluoreszenz das Basissignal signifikant übersteigt. Der CT ist um so niedriger, je höher die Menge an Zielsequenz ist und ist die Basis der Quantifizierung mit TaqMan PCR. Um Schwankungen in den Mengen an eingesetzter RNA und cDNA auszugleichen, wurde neben IFN α mRNA auch die Expression des „housekeeping gens“ GAPDH bestimmt und der DCT-Wert ($=CT_{GAPDH}-CT_{IFN\alpha}$) errechnet. Anhand des DCT Wertes läßt sich die IFN α Expression zwischen verschiedenen cDNAs vergleichen: $IFN\alpha$ mRNA in Probe A/ $IFN\alpha$ mRNA in Probe B = $2^{(DCT_{(A)}-DCT_{(B)})}$. Folgende Primer und TaqMan Sonden wurden verwendet (Lang 1998):

1 µl 3'-Primer (25 pmol/ µl) (MWG, München, Deutschland)

IFN γ	5'-CTT CAA GCC TAA GAA AAG AGT TCC-3'
GAPDH	5'-TTG ACG GTG CCA TGG AAT TTG-3'

1 µl 5'-Primer (25 pmol/ µl) (MWG, München, Deutschland)

IFN γ	5'-CTT GGC TTT TCA GCT CTG CAT C-3'
GAPDH	5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC-3'

1 µl Probe (10 pmol/ µl) (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)

IFN γ	5'-TTT GGG TTC TCT TGG CTG TTA CTG CCA
GAPDH	5'-CCT GGT CAC CAG GGC TGC TTT TAA-3'

Folgende Reagentien, die von Perkin-Elmer (Foster City, CA, USA) bezogen wurden, wurden mit 5 µl cDNA für die Realtime TaqMan-PCR eingesetzt:

5 µl Puffer

1 µl dNTP (10 mM)

2.5 µl MgCl₂ (25 mM)

1 µl Polymerase

32.5 µl Wasser

Für die PCR-Reaktion wurden folgenden Zyklusbedingungen gewählt: 95°C für 10 min und 40 Zyklen mit 95°C für 10 sek, 58°C für 20 sek („annealing“-Temperatur), und 72°C für 30 sek (Extinktionstemperatur). PCR-Reaktion und Fluoreszenzmessung wurde mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) durchgeführt.

3.3.3 Messung der Expression von Oberflächenantigenen mittels Durchflußzytometrie (FACS)

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie kann man Zellen nach ihrer Größe („forward scatter“ = FS), nach ihrer Granularität („sideward scatter“ = SS) und nach ihrer Fluoreszenz beurteilen. Die Fluoreszenz der Zellen ist abhängig von dem Grad ihrer Eigenfluoreszenz und den verwendeten Antikörpern. Die Antikörper, die gegen verschiedene Oberflächenantigene der Zellen gerichtet sind, sind mit Farbstoffen markiert. Durch Einsatz unterschiedlicher

Antikörper, die z.B. gegen Differenzierungsflächenantigene („linage marker“) gerichtet sind, kann die Expression bestimmter Aktivierungsflächenantigene in Zellsubpopulationen getrennt ermittelt werden.

Abb. 1A zeigt die Auftrennung einer PBMZ Population nach dem FS und SS. Es sind zwei Populationen erkennbar, die durch das Definieren von „Gates“ näher charakterisiert werden können. Abb. 1C zeigt die Färbung der Zellpopulation im Gate C, die zum Großteil aus Makrophagen und Monozyten besteht, was einerseits schon auf Grund ihrer Größe zu vermuten ist und andererseits durch die CD14-Färbung bestätigt wird. In Abb. 1B ist die Färbung der Zellen im Gate B dargestellt. Die Zellen dieses Gates sind klein und wenig granuliert, dementsprechend findet man kaum CD14⁺-Zellen, jedoch einen hohen Prozentsatz an CD8⁺- Zellen

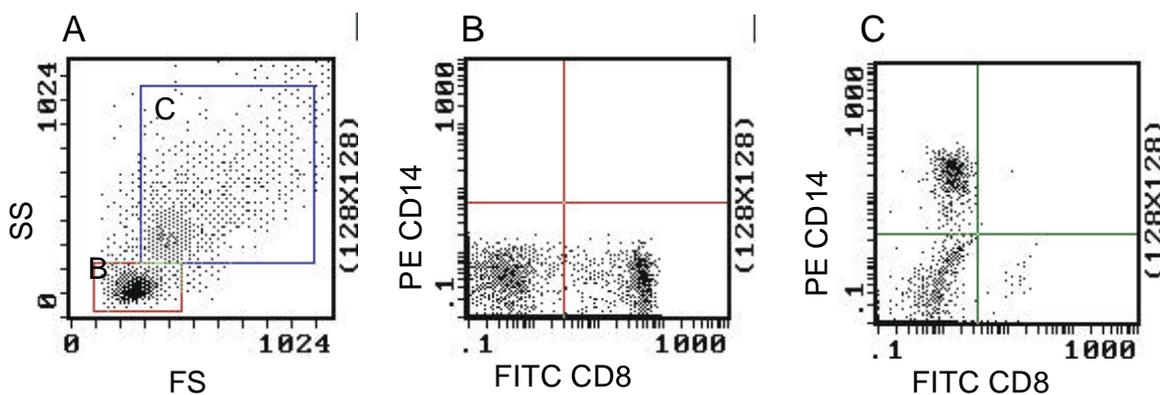


Abb. 1 Durchflußzytometrische Färbung von PBMZ:

1x 10⁶ PBMZ wurden mit PE-markiertem anti CD14 und FITC-markiertem anti CD8 gefärbt. In den dargestellten Histogrammen sind die Zellen in Abhängigkeit von ihrem FS und SS (A) bzw. in Abhängigkeit von ihrer FITC- und PE-Fluoreszenz (B und C) dargestellt. Abb. 1B zeigt die Färbung der Zellen des Gates B, während Abb 1C die Färbung der Zellen in Gate C darstellt.

Zur Durchführung der Färbung wurden PBMZ (5x 10⁶/ ml) in 24-well-Platten, T-Lymphozyten (0.5 - 1x 10⁶/ ml) in 96-well-Platten bei 37 °C unter Zugabe verschiedener Stimuli kultiviert. Falls in der Experimentdurchführung nicht ausdrücklich erwähnt, wurden die Zellen nach 24 h gefärbt.

Die Zellen wurden mit PBS mit 2 % FKS gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit humanem Immunglobulin G (IgG, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland) für 10 min bei RT vorinkubiert. Die verwendeten Antikörper waren entweder direkt FITC, PE oder Peridinchlorophyllprotein (PerCP) markiert oder mit Biotin konjugiert.

Für die spezifischen Färbungen wurden die Zellen in einem Volumen von 150 µl PBS mit 2 % FKS und 3 µl des entsprechenden Antikörpers für 30 min bei 4°C inkubiert und daraufhin zweimal mit PBS mit 2 % FKS gewaschen. Bei Verwendung von biotinmarkierten Antikörpern wurden die Zellen in einem darauffolgenden Schritt in einem Volumen von 150 µl PBS mit 2 % FKS mit 1.5 µl Streptavidin-Fluorochrom-Konjugaten (Pharmingen, San Diego, CA, USA) für 30 min bei 4°C inkubiert und nochmals gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden mit 1 % Paraformaldehyd Lösung fixiert und durchflußzytometrisch analysiert. Antikörper gegen folgende Oberflächenantigene wurden für die Färbungen verwendet:

Oberflächenantige	Herkunft
CD3	Immunotech, Marseilles, Frankreich
CD3	Pharmingen, San Diego, CA, USA
CD4	Pharmingen, San Diego, CA, USA
CD8	Pharmingen, San Diego, CA, USA
CD16	Pharmingen, San Diego, CA, USA
CD19	Pharmingen, San Diego, CA, USA
CD25	Pharmingen, San Diego, CA, USA
CD28	Immunotech, Marseilles, Frankreich
CD54	Pharmingen, San Diego, CA, USA
CD56	Pharmingen, San Diego, CA, USA
CD69	Pharmingen, San Diego, CA, USA
αβTCR	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Isotypkontrolle IgG1	Pharmingen, San Diego, CA, USA

Alle Antikörper waren IgG1 Antikörper aus der Maus.

4 Ergebnisse

4.1 ODN auf gereinigten humanen T-Lymphozyten

Die Stimulation von T-Lymphozyten erfolgt über zwei Signale, von denen eines T-Zellrezeptor vermittelt ist. Das zweite Signal wird über kostimulatorische Moleküle wie CD28, LFA-1, Integrine oder den IL-2-Rezeptor überbracht.

Im murinen Immunsystem können CpG-ODN (Bendigs 1999) oder G-reiche ODN (Lipford 1998) die Funktion des Signal 2 übernehmen und als Kostimulator auf gereinigte T-Zellen wirken, die über den TZR stimuliert werden. Kann eine ähnliche kostimulatorische Aktivität von ODN auch auf gereinigten humanen T-Lymphozyten beobachtet werden?

4.1.1 Etablierung eines Systems zur Kostimulation von T-Zellen

Analog zu dem von Bendigs et al. 1999 verwendeten in vitro T-Zellstimulationsmodell wurden aus PBMZ aufgereinigte humane T-Zellen mit immobilisierten Antikörpern gegen den TZR-Komplex (anti human TZR oder anti human CD3) (Signal 1) stimuliert. Der Einfluß von Signal 2 wurde durch Koimmobilisation von aufsteigenden Konzentrationen eines anti human CD28 Antikörpers untersucht.

Abb. 2A zeigt, daß die Stimulation der T-Lymphozyten mit anti human $\alpha\beta$ TZR als Signal 1 strikt abhängig ist von der Anwesenheit des Signal 2. Die maximale Kostimulation dieses Systems wird mit einer $\alpha\beta$ TZR-Antikörperkonzentration von 0.5 - 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erreicht, wobei auch die Konzentration des Signal 2 das Ausmaß der Proliferation beeinflusst.

Auch unter Verwendung von anti human CD3 als Signal 1 (siehe Abb. 2B) erreicht man mit einer Konzentration von 0.5 - 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ einen Sättigungseffekt. Im Unterschied zur Stimulation mit anti human $\alpha\beta$ TZR ist dieses System nicht strikt abhängig von einem Signal 2, denn hohe Konzentrationen ($> 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) von anti human CD3 wirken allein schon mitogen.

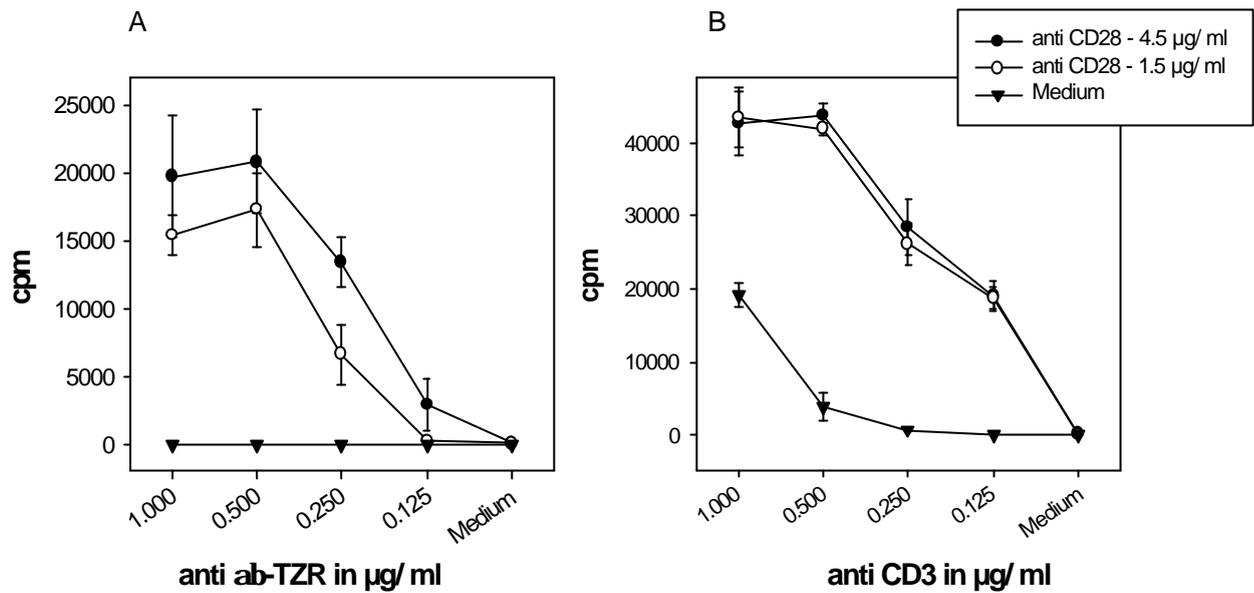


Abb. 2 Die Proliferation humaner T-Lymphozyten ist abhängig von der Konzentration des Signal 1 und des Signal 2:

2×10^4 humane T-Zellen/ well wurden in 96-well-F-Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen von anti human $\alpha\beta$ TZR (A) bzw. anti human CD3 (B) und anti human CD28 bzw. Medium stimuliert. Die Proliferationsrate wurde am Tag 4 mittels [^3H] Thymidineinbauassay gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwert und Standardabweichung, die aus Vierfachansätzen innerhalb eines Versuchs errechnet wurden.

4.1.2 Untersuchung der kostimulierenden Wirkung von ODN auf ruhende T-Lymphozyten unter Verwendung von submitogenen Konzentrationen des Signal 1

4.1.2.1 Effekte von phosphorotioatstabilisierten ODN auf T-Zellen aus PBMZ

Um einen möglichen kostimulatorischen Effekt von ODN, wie er für murine T-Lymphozyten beschrieben ist, zu untersuchen, wurden humane T-Zellen aus PBMZ mit submitogenen anti human CD3 Konzentrationen bzw. anti human $\alpha\beta$ TZR und verschiedenen ODN in Konzentrationen von 10 - 0.2 μM stimuliert und die Proliferation gemessen. Als

Positivkontrollen dienten die etablierten Kostimuli anti human CD28 und IL-2. Untersucht wurden folgende ODN:

1. ODN mit CpG-Motiven:

Die Sequenz dieser ODN beinhaltet ein oder mehrere Cytosin-Guanosin-Dinukleotide. Es ist bekannt, daß das CpG-Motiv in vertebraler DNA supprimiert wird bzw. häufig in methylierter Form vorkommt (Bird 1986). CpG-Motive sind für die stimulatorische Wirkung von bakterieller DNA und synthetischen ODN auf murine und humane B-Zellen und APZ wie Makrophagen und dendritische Zellen verantwortlich (Bauer 1999, Krieg 1995, Sparwasser 1997, Jacob 1999). Die folgenden CpG-ODN wurden verwendet:

- **2006** und **DSP30**, die die Proliferation von humanen B-Zellen und die Freisetzung von Zytokinen wie IL-12 und IL-6 induzieren (Bauer 1999)
- **1668** und **1628**, die sowohl Zellen des erworbenen Immunsystems (Lymphozyten) als auch Zellen des angeborenen Immunsystems (APZ) der Maus aktivieren (Lipford² 1997, Bendigs 1999).

2. Zugehörige Kontroll-ODN, bei denen das immunstimulierende Cytosin-Guanosin-Paar durch ein Guanosin-Cytosin-Paar ersetzt wurde. Zu dieser Gruppe zählen:

- **2006K** und **DSP30K**, die aus der Modifikation der ODN 2006 und DSP30 entstehen
- **1720**, das aus dem modifizierten 1668 entsteht.

3. ODN mit G-reichen Sequenzen:

Die Sequenzen dieser ODN enthalten an zentraler Stelle einen Block bestehend aus fünf Guanosin.

- **PZ1, PZ2, PZ3** und **GRI**, die kostimulatorische Aktivität auf murinen T-Zellen zeigen und die Proliferation von Makrophagen-Progentitoren aus murinen Knochenmarkszellen induzieren (Lang 1999).

4. Kontroll-ODN, die aus Modifizierungen der Oligonukleotide PZ1, PZ2 und PZ3 entstehen, indem das zentrale G-Pentamer durch Ersatz von Guanosin mit Thymidin zerstört wird. Zu diesen ODN

zählen:

- **PZ4** und **PZ5**.

5. ODN, die sich aus Oligo-Adenosin-, -Guanosin-, -Cytosin- und -Thymidin-Sequenzen zusammensetzen und als Kontrolle für sequenzunabhängige Effekte der phosphorothioatmodifizierten synthetischen ODN dienen:

- *OligoA, OligoG, OligoC* und *OligoT*.

Die Ergebnisse der Stimulation von T-Zellen mit submitogenen anti human CD3-Konzentrationen und ODN sind in Abb. 3A dargestellt. Eine kostimulatorische Wirkung von ODN auf humane T-Zellen konnte für keines der ODN nachgewiesen werden; weder unter Verwendung von anti human CD3 noch unter Verwendung von anti human $\alpha\beta$ TZR als Signal 1. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen, die unter Verwendung muriner T-Zellen erhoben wurden (siehe Abb. 3B). Im murinen System wirken die G-reichen PZ-ODN deutlich kostimulatorisch. Als Positivkontrolle wurde IL-2 (10 U/ ml) verwendet, als Kontrolle für eventuelle APZ-Verunreinigungen wurde LPS (10 μ g/ ml) eingesetzt.

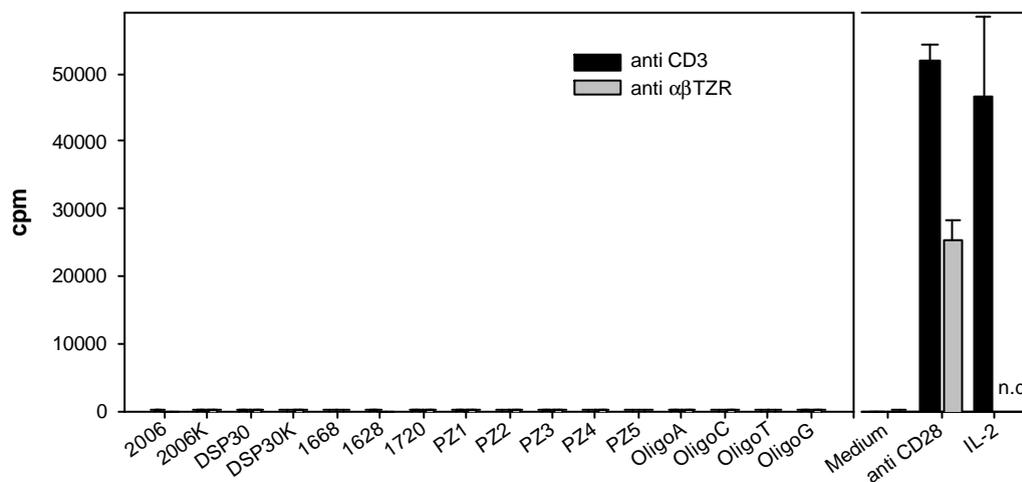


Abb. 3A Eine kostimulatorische Wirkung der ODN auf gereinigte humane T-Lymphozyten ist nicht nachweisbar:

2×10^4 T-Zellen/ well wurden mit immobilisiertem anti human CD3 (0.2 μ g/ ml) bzw. anti human $\alpha\beta$ TZR (1 μ g/ ml) und löslichen ODN in Konzentrationen von 10 μ M, 5 μ M, 2.5 μ M, 1.25 μ M, 0.6 μ M und 0.3 μ M stimuliert. Am Tag 4 wurde die [3 H] Thymidininkorporation gemessen und als Mittelwert aus Vierfachbestimmungen dargestellt. Die Positivkontrolle anti human CD28 wurde in einer Konzentration von 4.5 μ g/ ml eingesetzt, die IL-2-Konzentration betrug 10 U/ ml. Die Kontrollstimulation von anti $\alpha\beta$ TZR und IL-2 wurde nicht durchgeführt (=n.d.).

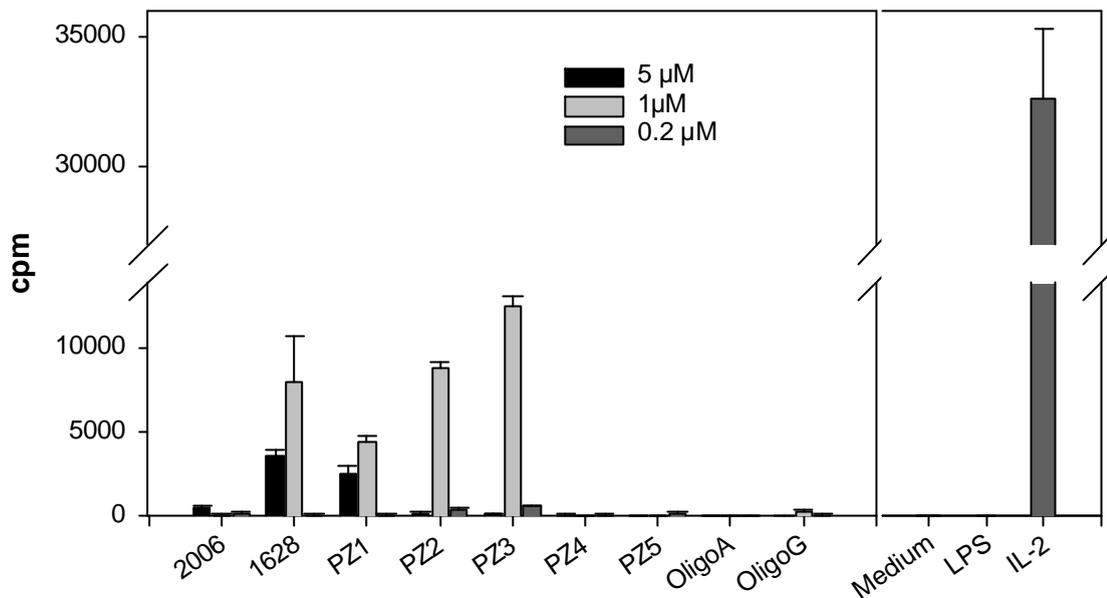


Abb. 3B Kostimulatorische Wirkung von G-reichen ODN auf murine T-Lymphozyten (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Sylvia Bendigs):

6×10^5 murine T-Zellen/ well wurden mit immobilisiertem anti murin CD3 (1 µg/ ml) und löslichen ODN in Konzentrationen von 5 µM, 1 µM und 0.2 µM oder IL-2 (10 U/ ml), LPS (10 µg/ ml) bzw. Medium stimuliert. Am Tag 3 wurde die [^3H] Thymidininkorporation gemessen und als Mittelwert aus Vierfachbestimmungen dargestellt.

4.1.2.2 Wirkung von Phosphodiester-ODN und „teilprotektierten“ ODN auf T-Zellen

Um auszuschließen, daß die Phosphorothioat-Modifikation die Ursache für die fehlende kostimulatorische Wirkung auf humane T-Zellen ist, wurden sowohl Phosphordiester-ODN als auch „teilprotektierte“ ODN eingesetzt. Die Modifikation von teilprotektierten ODN besteht darin, daß die jeweils letzten vier Basen am 5'- bzw. 3'- Ende durch eine Phosphorothioatbindung miteinander verbunden sind, während die mittleren 12 - 19 Basen durch eine Phosphordiesterbindung verknüpft sind. Die teilprotektierten ODN sind verglichen mit Phosphordiester-ODN stabiler gegenüber DNAsen und entsprechen im Gegensatz zu den phosphorothioatstabilisierten ODN eher der natürlich vorkommenden DNA. Ballas et al. zeigte, daß die stimulatorische Potenz teilprotektierter ODN bezüglich der NK-Zellaktivierung größer ist als die der phosphorothioatmodifizierten ODN. Auch die so modifizierten ODN zeigten auf humanen T-Lymphozyten keine kostimulatorischen Effekte.

4.1.2.3 Effekte der ODN auf T-Lymphozyten aus Tonsillen

Die kostimulatorischen Effekte der ODN im murinen System wurden an T-Zellen aus Lymphknoten untersucht, während in den hier beschriebenen Experimenten zirkulierende T-Zellen aus dem peripheren Blut eingesetzt wurden. Zum Ausschluß einer unterschiedlichen Reaktivität von T-Lymphozyten aus peripherem Blut und lymphoidem Gewebe, wurden Versuche wie in 4.1.2.1 und 4.1.2.2 beschrieben unter Verwendung von T-Lymphozyten aus Tonsillen durchgeführt. Auch hier konnte keine kostimulatorische Wirkung der ODN auf humane T-Zellen gezeigt werden.

4.1.3 Untersuchung der Wirkung von ODN auf aktivierte T-Lymphozyten unter Verwendung von mitogenen Konzentrationen des Signal 1

4.1.3.1 Proliferation

Um die Auswirkungen von ODN auf aktivierte T-Zellen zu überprüfen, wurden zwei unterschiedliche Stimulationssysteme verwendet:

- Stimulation mit 1 µg/ ml immobilisiertem anti human CD3
- Stimulation mit 0.2 µg/ ml immobilisiertem anti human CD3 und 4 µg/ ml immobilisiertem anti human CD28.

Abb. 4A zeigt die Ergebnisse der Stimulation mit 1 µg/ ml anti human CD3. Die durch die Stimulation mit anti human CD3 ausgelöste Proliferation wird durch lösliches ODN in hohen Konzentrationen (1.25 - 2.5 µM) gehemmt. Diese suppressive Wirkung erscheint um so ausgeprägter je G-reicher die Sequenz des verwendeten ODN ist, vgl. PZ1/1628/PZ2 mit OligoA/2006/2006K.

Bei Stimulation mit 0.2 µg/ ml anti human CD3 und 4 µg/ ml anti human CD28 war ein vergleichbarer Effekt der untersuchten ODN zu beobachten (siehe Abb. 3B).

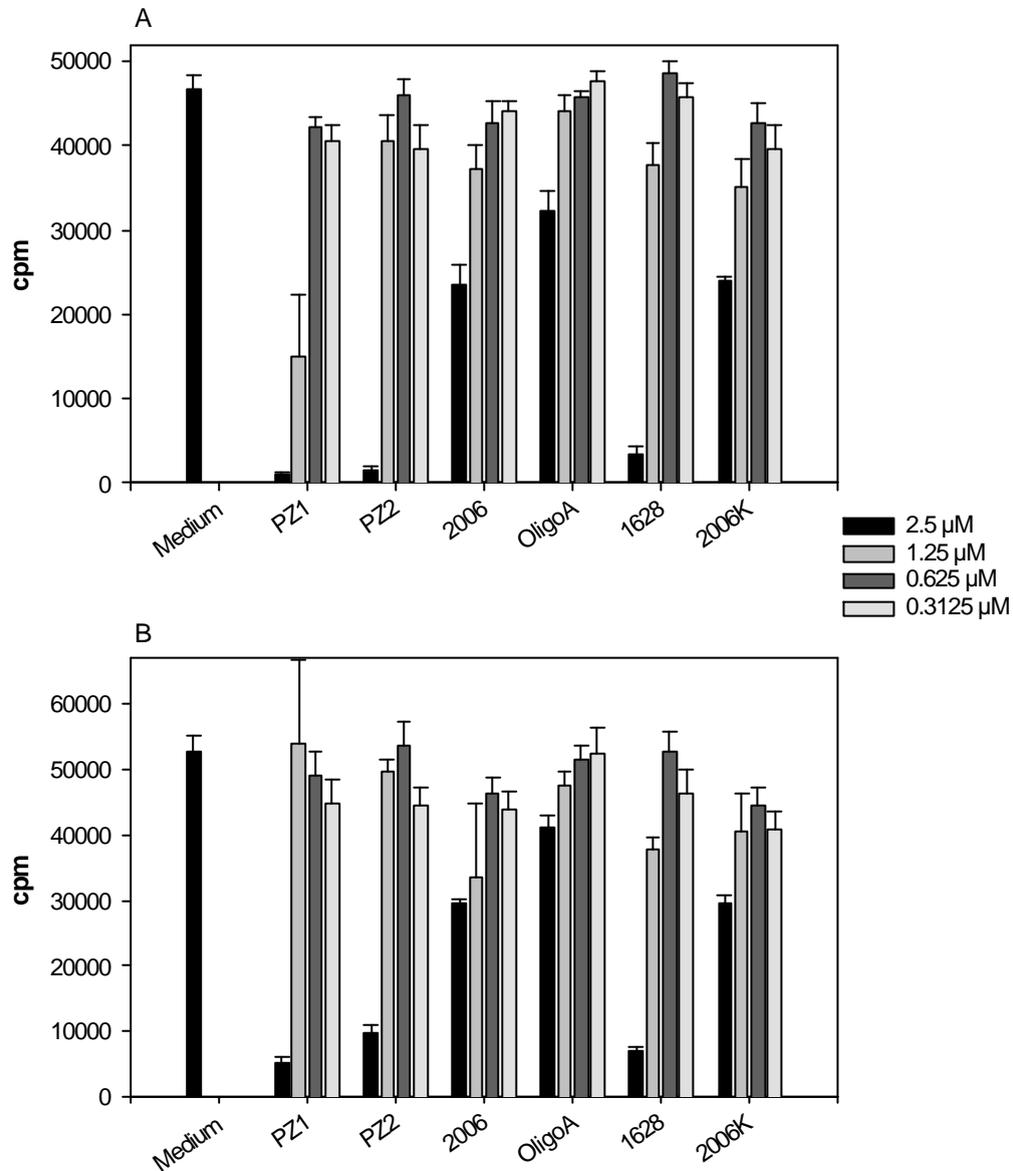


Abb. 4 Hohe Konzentrationen von G-reichen ODN hemmen die Proliferation aktivierter T-Zellen:

3×10^4 T-Zellen/ well wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ anti human CD3 (A) bzw. $0.2 \mu\text{g/ml}$ anti human CD3 und $4 \mu\text{g/ml}$ anti human CD28 (B) unter Zugabe unterschiedlicher ODN-Konzentrationen kultiviert. Die Bestimmung des $[^3\text{H}]$ Thymidineinbaus erfolgte am Tag 4. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung ermittelt aus Vierfachansätzen.

4.1.3.2 Expression von Oberflächenmolekülen

Die Proliferation ist ein spätes Ereignis der T-Zellaktivierung. Um einzugrenzen, auf welcher Ebene G-reiche ODN mit der Aktivierung von T-Zellen interferieren, wurden auch die Produktion der T-Zellzytokine IL-2 und IFN γ und die Expression von Oberflächenmolekülen untersucht.

CD69 ist ein sensibler Marker der T-Zellaktivierung; obwohl seine Funktion noch unklar ist, läßt er sich aber schon wenige Stunden nach Stimulation nachweisen. Im Gegensatz dazu ist die Expression von CD25 (=alpha-Kette des hochaffinen IL-2-Rezeptors) strikter reguliert und eine Voraussetzung für den Eintritt der aktivierten T-Zelle in den Zellzyklus. CD54 (ICAM) wird im Rahmen der T-Zellaktivierung ebenfalls verstärkt exprimiert und ist für die Zellinteraktion wichtig.

Nach Stimulation gereinigter T-Lymphozyten mit einer mitogenen Konzentration an anti human CD3 wurde der Einfluß des G-reichen ODN PZ2 bzw. des Kontroll-ODN PZ5 auf die Expression von CD69, CD25 und CD54 durchflußzytometrisch untersucht (siehe Abb. 5).

Die Stimulation mit anti human CD3 führt zu einer vermehrten Expression aller untersuchten Oberflächenmoleküle: 57.6 % der Zellen exprimieren CD69, 21.5 % der Zellen CD25 und 42.9 % der Zellen werden CD54⁺. Wird das G-reiche ODN PZ2 zur Kultur gegeben, ist eine starke Suppression der Induktion dieser Oberflächenmoleküle zu beobachten: die CD69-Expression beträgt unter diesen Bedingungen 21.9 %, die CD25-Expression 2.7 % und die CD54-Expression 4.5 %. Die Suppression der Expression von Oberflächenmolekülen ist konzentrations- und sequenzabhängig, denn bei einer Konzentration von 1 μ M PZ2 ist ein deutlich abgeschwächter bzw. unter Verwendung des Kontroll-ODN PZ5 kein supressiver Effekt erkennbar.

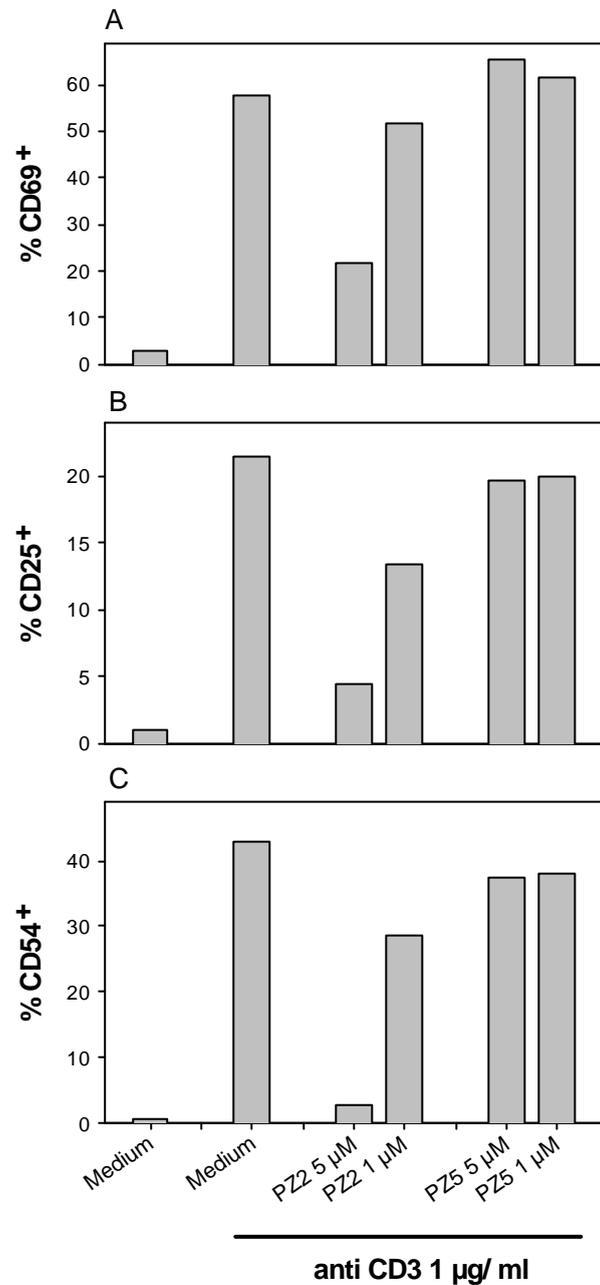


Abb. 5 Hochkonzentrierte G-reiche ODN supprimieren die Expression von CD69, CD25 und CD54: 2×10^5 T-Zellen/ well wurden mit Medium oder 1 µg/ ml anti human CD3 mit oder ohne ODN kultiviert. Nach 24 h wurden die Prozentsätze der CD69⁺- (A), CD25⁺- (B), und CD54⁺- (C) Zellen ermittelt.

4.1.3.3 Zytokinproduktion

Aktivierte T-Zellen können Zytokine produzieren. Es ist bekannt, daß die Stimulation mit anti human CD3 und anti human CD28 eine gesteigerte IL-2-Synthese bewirkt (Baroja 1989).

Unter diesem Gesichtspunkt stellte sich die Frage, ob eine verminderte Zytokinproduktion an der suppressiven Wirkung der G-reichen ODN beteiligt ist.

Die Versuchsdurchführung entsprach der unter 4.1.3.2.

In Abb. 6A und 6B sind die Ergebnisse dieses Versuchs zusammengefaßt. Sowohl die IL-2-Produktion als auch die IFN γ -Produktion werden durch die Anwesenheit des ODN PZ2 in einer Konzentration von 5 μ M vollständig unterdrückt. Die niedrigere Konzentrationen von PZ2 (1 μ M) führt nicht zu einer völligen Supression der Zytokinproduktion. Das auch hier als Kontrolle eingesetzte PZ5 hat keinen Einfluß auf die Zytokinausschüttung.

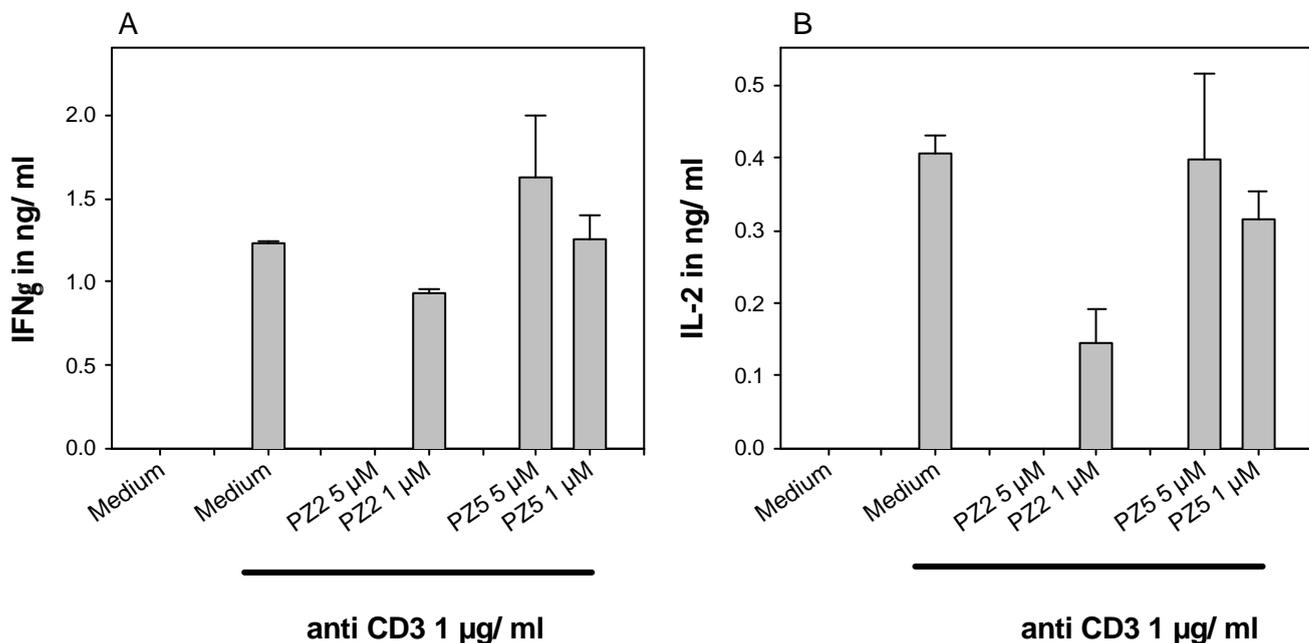


Abb. 6 Hochkonzentrierte G-reiche ODN hemmen die Zytokinproduktion aktivierter T-Lymphozyten: 2×10^5 T-Zellen/ well wurden mit Medium oder 1 μ g/ml anti human CD3 mit oder ohne ODN kultiviert. Nach 24 h wurden die Überstände der Kulturen abgenommen und ihre IFN γ - (A) bzw. IL-2- (B) Konzentrationen mittels Elisa bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen.

4.1.3.4 Zeitpunkt der ODN-Zugabe

Suppressive Wirkungen können durch zytotoxische Effekte entstehen, die einerseits zum Zelltod führen können andererseits zum „Abschalten“ der Zellen.

Um diesen Wirkmechanismus der G-reichen ODN auszuschließen, wurden die T-Zellen in einem Versuch mit den ODN vorinkubiert, in einem anderem Experiment erfolgte die verzögerte Zugabe der ODN zu Kulturen, die mit anti human CD3 stimuliert wurden:

- T-Zellen wurden mit Medium, unterschiedlichen Konzentrationen von G-reichen ODN und ihren Kontrollen für 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h vorinkubiert und nach mehrmaligem Waschen auf mit anti human CD3 beschichtete Platten transferiert. Nach 4 Tagen erfolgte die Messung der Proliferation. Die Vorinkubation der Zellen mit G-reichen ODN führte nicht zu einer Suppression der Proliferation, die durch anti human CD3 induziert wurde.
- Mit anti human CD3 stimulierten T-Lymphozyten wurde PZ2 in unterschiedlichen Konzentrationen nach 0 h , 2 h , 12 h und 48 h zugegeben. Wie Abb. 7 zeigt, nimmt der suppressive Effekt des PZ2, wenn die Zugabe 12 h nach Stimulationsbeginn erfolgt, ab.

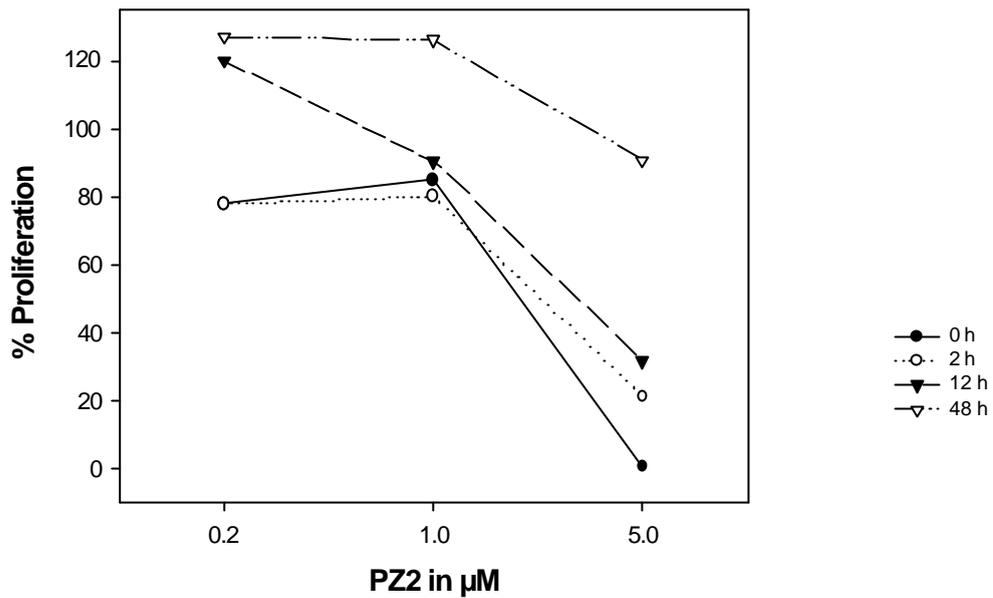


Abb. 7 Die suppressiven Effekte der G-reichen ODN sind vom Zeitpunkt der ODN-Zugabe abhängig: 2×10^4 T-Zellen/ well wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ anti human CD3 stimuliert. Den Kulturen wurde nach 0 h, 2 h, 12 h, 48 h PZ2 in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Am Tag 3 wurde die $[^3\text{H}]$ Tymidininkorporation gemessen. Es wurden die absoluten Proliferationswerte in Bezug zur Kontrolle (T-Zellen stimuliert mit anti human CD3 und Medium) gesetzt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß es sich bei der suppressiven Wirkung der ODN nicht um zytotoxische Effekte handelt und daß die erfolgreiche Supression nur dann stattfindet, wenn Stimulus (anti human CD3) und ODN gleichzeitig anwesend sind.

4.2 Indirekte Effekte von ODN auf humane T-Zellen, die sich in einem PBMZ-Verband befinden

4.2.1 Etablierung eines Systems zur Stimulation von T-Lymphozyten in Anwesenheit anderer mononukleärer Zellen

Um indirekte Effekte auf T-Zellen nachweisen zu können, mußte ein System etabliert werden, das zwei Anforderungen erfüllen sollte:

1. Stimulation der T-Zellen im Sinne eines Signal 1
2. Möglichkeiten der Kostimulation der teilaktivierten T-Lymphozyten.

Zu diesem Zweck erfolgte die Stimulation der PBMZ mit unterschiedlichen Konzentrationen an löslichem anti human CD3. Nach 24 h wurden die PBMZ gleichzeitig mit anti CD4 zur T-Zelldifferenzierung und anti CD25 bzw. anti CD69 zur Quantifizierung der Aktivierung gefärbt.

In Abb. 8 sind die Ergebnisse dieser Titration dargestellt. Bei Stimulation mit Konzentrationen von anti human CD3 > 20 ng/ ml sind die T-Zellen, gemessen an der CD69- und CD25-Expression, stark aktiviert, wobei mit einer Konzentration von 4 ng/ ml anti human CD3 keine Expression der Aktivierungsmarker induziert wird.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden für die folgenden Versuche anti human CD3 Konzentrationen von 10 ng/ ml zur Teilaktivierung und 100 ng/ ml zur Vollaktivierung der T-Lymphozyten eingesetzt.

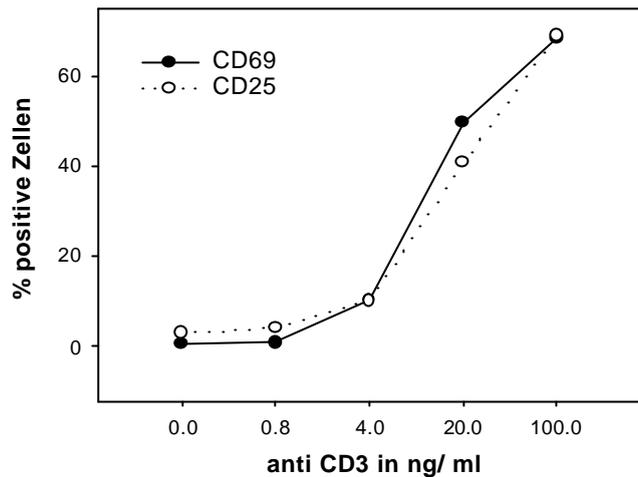


Abb. 8 Die CD25- und CD69-Expression von CD4⁺-Zellen ist von der anti human CD3-Konzentration abhängig: 5x 10⁶ PBMZ/ well wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von löslichem anti human CD3 stimuliert. Nach 24 h wurden die Prozentsätze der CD69⁺- bzw. der CD25⁺-Zellen innerhalb der CD4⁺-Zellen ermittelt

4.2.2 Untersuchung indirekter Effekte der ODN auf humane T-Zellen

4.2.2.1 Expression von Oberflächenmolekülen

Eine Aktivierung von Subpopulationen in einem Zellverband ist durch Färbung von Oberflächenantigenen gut nachweisbar.

PBMZ wurden mit einer Konzentration von 10 ng/ ml anti human CD3 mit oder ohne ODN stimuliert und der Prozentsatz der CD69-Positiven bzw. CD25-Positiven unter Einbeziehung der Differenzierungsantigene gemessen. Die Prozentsätze der CD69⁺- bzw. CD25⁺-Zellen wurden für die CD4⁺- (T-Helferzellen), CD8⁺- (zytotoxische T-Zellen), CD19⁺- (B-Zellen) und die CD16⁺/ CD56⁺- (NK-Zellen) Zellpopulationen getrennt ermittelt.

Folgende ODN wurden verwendet:

- **2006**, als Vertreter der im humanen Immunsystem wirksamen CpG-Oligonukleotide,
- **2006K**, das auf Grund der Modifikation (siehe 4.1.2.1) seiner Sequenz als Kontrolle des 2006 eingesetzt wurde und
- **API**, das ebenfalls als Kontroll-ODN Verwendung fand.

Positivkontrolle für eine maximale T-Zellstimulation waren 100 ng/ ml anti human CD3.

CD69-Expression

In Abb. 9A sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments gezeigt. Während Abb. 9B die Zusammenfassung mehrerer unabhängiger Experimente darstellt. Zusatz von 2006 zu den PBMZ-Kulturen in Abwesenheit von anti human CD3 hat nur einen geringen Effekt auf die CD69-Expression der CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen. Im Gegensatz dazu induziert die Stimulation mit 2006 auf einem hohen Prozentsatz der CD19⁺-Zellen und einem etwas geringeren Prozentsatz der NK-Zellen eine CD69-Expression. Die Stimulation mit 100 ng/ ml anti human CD3 führt wie erwartet zu einem hohen Prozentsatz CD69⁺-Zellen innerhalb der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen. Auch CD19⁺-B-Zelle exprimieren nach Zugabe von 100 ng/ ml anti human CD3 CD69, während nur ein geringer Prozentsatz CD69⁺ NK-Zellen zu beobachten ist. Die CD69-Expression, induziert durch 10 ng/ ml anti human CD3 auf T- und B-Zellen ist weniger ausgeprägt als die, die durch 100 ng/ ml anti human CD3 induziert wird. Bei kombinierter Zugabe von 2006 und 10 ng/ ml anti human CD3 erhöht sich der Prozentsatz der CD69⁺-Zellen innerhalb der T-Zellpopulation signifikant, verglichen mit den Prozentsätzen induziert durch anti human CD3 alleine bzw. in Kombination mit AP1. Auf die NK-Zellen hat die gemeinsame Stimulation mit anti human CD3 (10 ng/ ml) und 2006 einen synergistischen Effekt bezüglich der CD69-Expression, während die CD69-Expression der B-Zellen sowohl durch die Kombination von 2006 mit anti human CD3 als auch durch die Kombination von 2006K bzw. AP1 mit anti human CD3 gesteigert wird.

CD69 wird als „early activation antigen“ bezeichnet, da die Induktion der CD69-mRNA bereits 30 – 60 min nach Stimulationsbeginn ein Maximum erreicht (Ziegler 1994) und auch die CD69-Expression schon nach 6 – 12-stündiger Stimulation gemessen werden kann (Carston 1997).

Um der Kinetik der CD69-Expression Rechnung zu tragen, wurden auch am Tag 2 Färbungen durchgeführt. Abb. 9A zeigt, daß die Anwesenheit von 2006 in den Kulturen die Abnahme der CD69-Expression am Tag 2 bezogen auf den Tag 1 verhindert. Während unter alleiniger Stimulation mit anti human CD3 der Prozentsatz von CD69 exprimierenden T-Zellen von 45.3 % am Tag 1 auf 27.2 % am Tag 2 abnimmt, bleibt der Prozentsatz der CD69⁺-Zellen bei gleichzeitiger Stimulation mit anti human CD3 und 2006 am Tag 1 und 2 fast konstant.

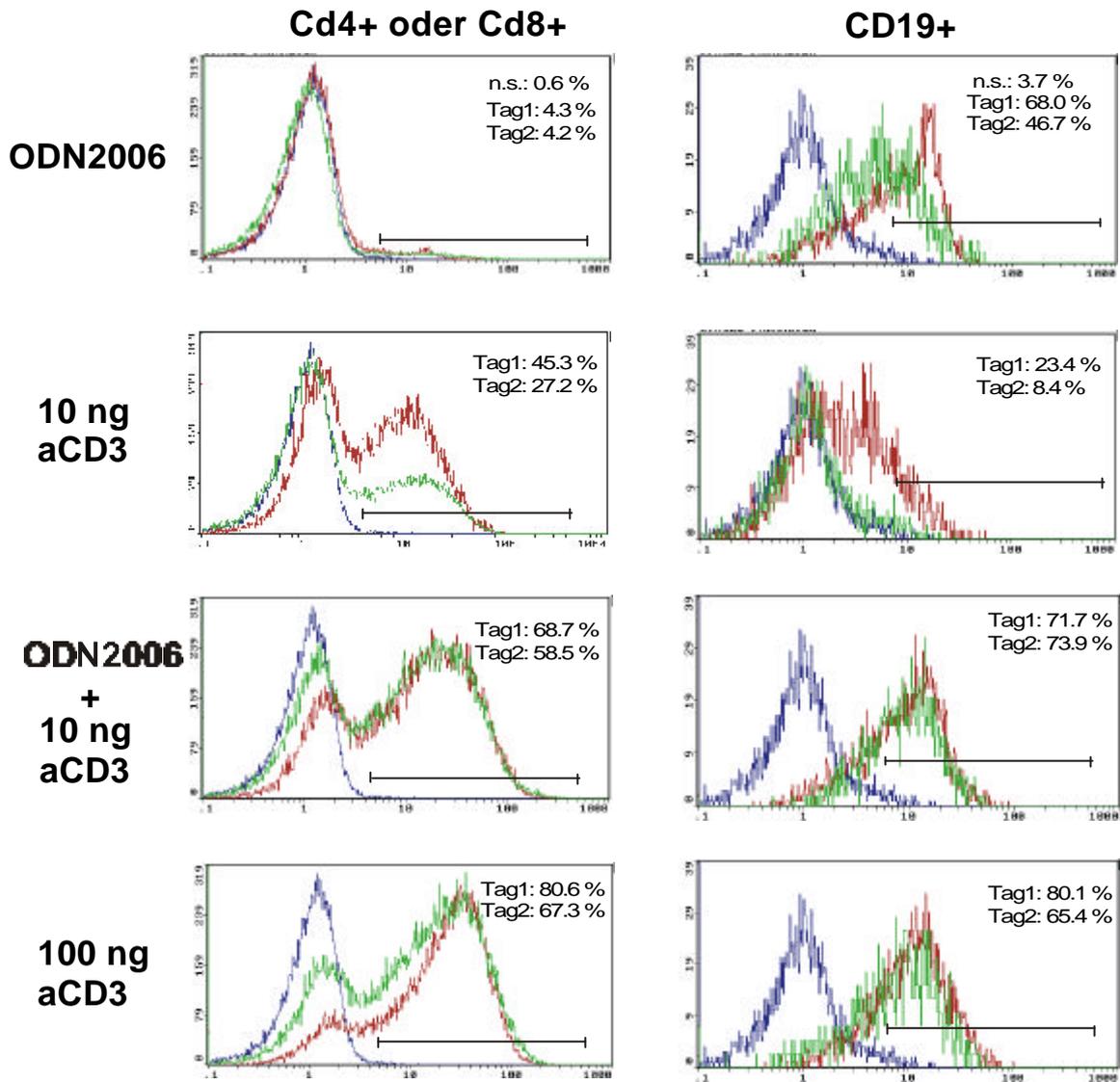


Abb. 9A Die Stimulation von PBMZ mit anti human CD3 und 2006 induziert CD69-Expression:

5x 10⁶ PBMZ wurden mit Medium (n.s.=nicht stimuliert), 2006, 10 ng/ ml anti human CD3 (=10ng aCD3) und 100 ng/ ml anti human CD3 (=100ng aCD3) stimuliert. Am Tag 1 und am Tag 2 wurden Färbungen mit FITC-markiertem anti CD69 durchgeführt. Gleichzeitig wurden die Zellen mit PE-markiertem anti CD19 oder mit PE-markiertem anti CD4 und anti CD8 gefärbt. Die linken Histogramme zeigen die Fitc-Fluoreszenz der CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen. In den rechten Histogrammen ist die Fitc-Fluoreszenz der CD19⁺-Zellen dargestellt.

CD69-Expression:
Mittelwert und Standardabweichung:
7 Experimente (CD4⁺)
5 Experimente (CD8⁺)
4 Experimente (CD19⁺)
3 Experimente (NK)

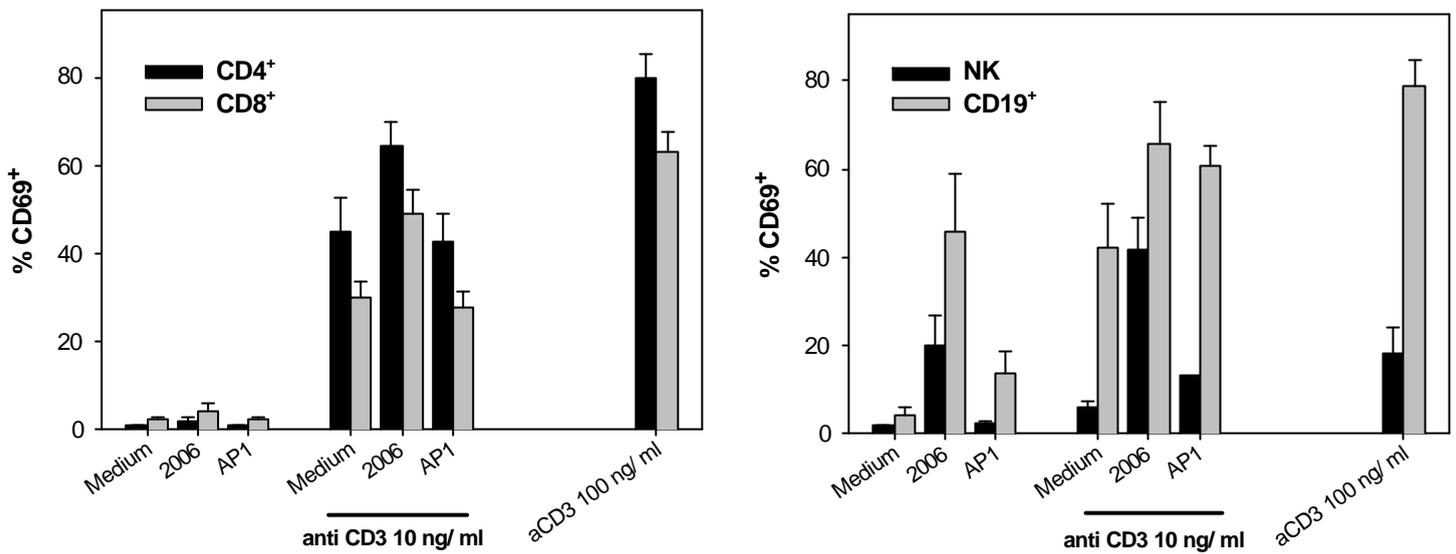


Abb. 9B Die Stimulation von PBMZ mit anti human CD3 und 2006 induziert CD69-Expression vor allem auf CD4⁺- und CD8⁺-Zellen:

5x 10⁶ PBMZ wurden mit Medium, 2006, 10 ng/ ml anti human CD3 und 100 ng/ ml anti human CD3 (=aCD3 100 ng/ ml) stimuliert. Nach 24 h wurden CD69-Färbungen und Färbungen der Differenzierungsmarker CD4, CD8, CD19 und CD16 zusammen mit CD56 (zur NK-Zelldifferenzierung) vorgenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

CD25-Expression

Eine Induktion der CD25-Expression, dem IL-2-Rezeptor, versetzt T-Lymphozyten in die Lage auf IL-2 zu reagieren und ist deswegen ein wichtiges Ereignis im Verlauf einer T-Zellaktivierung wie sie z.B. bei der Stimulation mit anti CD3 und anti CD28 stattfindet (Baroja 1989).

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die durch 2006 und anti human CD3 induzierte T-Zellaktivierung zu einer vermehrten CD25-Expression führt.

Abb. 9C faßt die Ergebnisse der CD25-Expression innerhalb der CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen von vier unabhängigen Experimenten zusammen. Es konnte keine signifikant höhere CD25-Expression durch die Stimulation mit anti human CD3 und CpG-ODN verglichen mit einer

alleinigen anti human CD3-Stimulation oder einer Stimulation mit anti human CD3 und AP1 gezeigt werden.

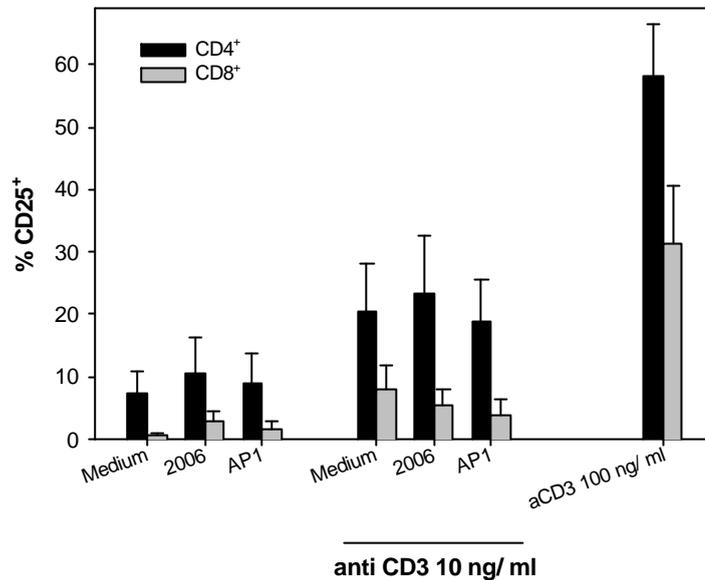


Abb. 9C Die Stimulation von PBMZ mit anti human CD3 und 2006 induziert keine vermehrte CD25-Expression:

5x 10⁶ PBMZ wurden mit Medium, 2006, 10 ng/ ml anti human CD3 und 100 ng/ ml anti human CD3(=aCD3 100 ng/ ml) stimuliert. Nach 24 h wurden CD25-Färbungen und Färbungen der Differenzierungsmarker CD4 und CD8 durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten.

4.2.2.2 Zytokinproduktion

Nachdem gezeigt werden konnte, daß durch indirekte Effekte der CpG-ODN T-Lymphozyten innerhalb einer PBMZ-Kultur teilaktiviert werden, stellte sich die Frage, ob die Stimulation mit anti human CD3 und CpG-ODN noch andere Effekte zeigt, wie z.B. eine Produktion von Zytokinen. Im Mausmodell ist in vivo durch die Verwendung von CpG-ODN als Adjuvans gezeigt, daß CpG-ODN die Entwicklung einer T_H1-Immunantwort unterstützen, welche unter anderem durch die Produktion von IFN γ charakterisiert ist (Lipford¹ 1997, Roman 1997). So stellte sich die Frage, ob durch die indirekten Effekte von CpG-ODN auf T-Zellen in Anwesenheit von APZ eine INF γ -Produktion induziert wird.

INFg-ELISA

Zur Lösung dieser Fragestellung wurden Überstände von PBMZ, die mit anti human CD3 alleine oder mit 2006 bzw. AP1 stimuliert wurden, auf ihre IFN γ -Konzentration hin überprüft. Wiederum dienten 100 ng/ ml anti human CD3 als Positivkontrolle.

Abb. 10 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse von acht Versuchen. Lösliches anti human CD3 in einer Konzentration von 100 ng/ ml induziert eine ausgeprägte IFN γ -Produktion, während eine Konzentration von 10 ng/ ml anti human CD3 bzw. die Stimulation mit 2006 alleine eine geringe bis nicht meßbaren IFN γ -Produktion induziert. Die kombinierte Stimulation mit niedrigdosiertem anti human CD3 (10 ng/ ml) und 2006 bewirkt eine signifikant höhere IFN γ -Produktion. Diese Zytokin-Produktion ist DNA-sequenzabhängig, da die Stimulation mit AP1 und niedrigdosiertem anti human CD3 zu kaum detektierbaren IFN γ -Werten führt.

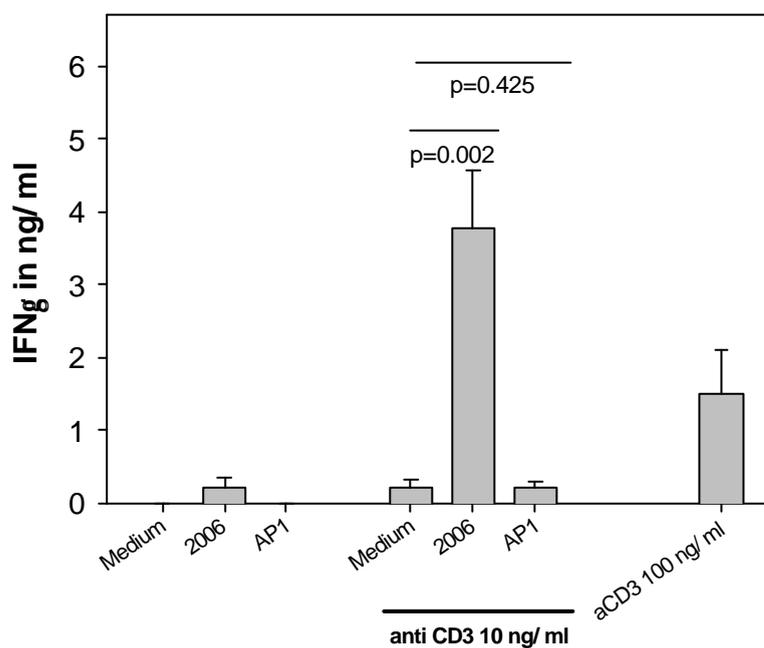


Abb. 10 Die Stimulation von PBMZ mit anti human CD3 und 2006 induziert IFN γ -Produktion:

5×10^6 PBMZ wurden mit Medium, 2006, 10 ng/ ml anti human CD3 und 100 ng/ ml anti human CD3 stimuliert. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und die IFN γ -Konzentration der Überstände mittels Elisa bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen, die aus acht unabhängigen Experimenten errechnet wurden.

Intrazelluläre INF γ -Färbungen

Um die INF γ -produzierenden Zellen zu charakterisieren, wurden intrazelluläre Färbungen durchgeführt.

In Abb. 11A sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments dargestellt. 2006 induziert eine geringe INF γ -Produktion in den CD4⁻/CD8⁻-Zellen, während man nach Stimulation mit hochdosiertem anti human CD3 einen hohen Prozentsatz INF γ ⁺-Zellen innerhalb der T-Zell-population findet. Die Stimulation mit 2006 und 10 ng/ ml anti human CD3 erhöht den Prozentsatz der INF γ ⁺-Zellen sowohl innerhalb der T-Zellen als auch der CD4⁻/CD8⁻-Zellen.

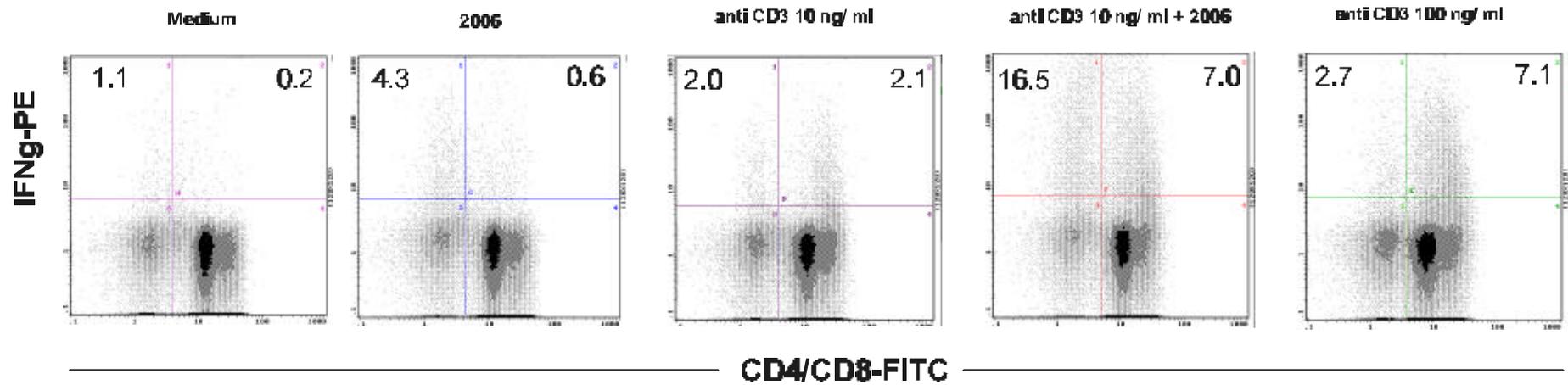


Abb. 11.A Die Stimulation von PBMZ mit anti human CD3 und 2006 induziert IFN γ -Produktion in CD4-positiven-, CD8-positiven- und CD4-negativen/CD8-negativen-Zellen:

5 Millionen PBMZ wurden mit Medium, 2006, 10 ng/ml anti human CD3 stimuliert. Nach 4 h wurde den Kulturen Brefeldin A zugegeben. Nach weiteren 12 h wurden die Zellen mit PE-markiertem anti IFN γ und FITC-markiertem anti CD4 und anti CD8 gefärbt. In den dargestellten Histogrammen sind die Prozentsätze der IFN γ -positiven Zellen bezogen auf die CD4-negativen/CD8-negativen-Zellpopulation bzw. auf die CD4-positiven- oder CD8-positiven- Zellen angegeben.

Zur weiteren Differenzierung wurden getrennte Färbungen für die folgenden Oberflächenantigene durchgeführt: CD4, CD8, CD19 und CD16. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß die B-Zellen an der $\text{IFN}\gamma$ -Produktion nicht beteiligt sind.

Dieses Ergebnis und die Tatsache, daß die $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD4}^-/\text{CD8}^-$ -Zellen sich mit anti CD16 färbten, läßt darauf schließen, daß es sich um NK-Zellen handelt.

Abb. 11B faßt die Ergebnisse von vier unabhängigen Versuchen zusammen. Dargestellt sind die Prozentsätze der $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Zellen innerhalb der CD4^+ -, CD8^+ - bzw der $\text{CD4}^-/\text{CD8}^-$ -Zellen. Die Kombination von 2006 mit 10 ng/ ml anti human CD3 induziert einen hohen Prozentsatz an $\text{IFN}\gamma^+$ -Zellen, vorallem innerhalb der CD8^+ - bzw. der $\text{CD4}^-/\text{CD8}^-$ -Zellpopulationen.

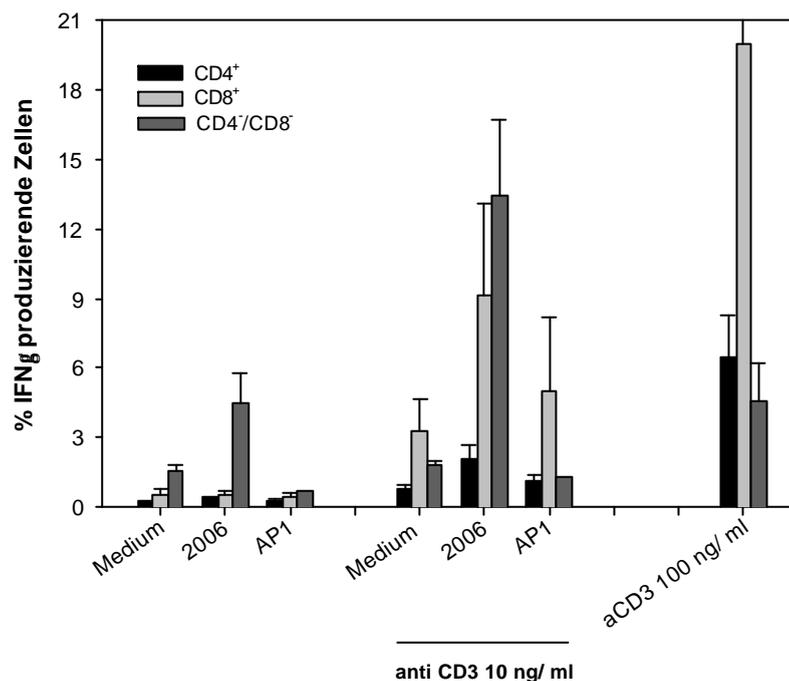


Abb. 11B Die Stimulation von PBMZ mit anti human CD3 und 2006 induziert $\text{IFN}\gamma$ -Produktion vorallem innerhalb der CD8^+ - und $\text{CD4}^-/\text{CD8}^-$ -Zellpopulationen:

5×10^6 PBMZ wurden mit Medium, 2006, 10 ng/ ml anti human CD3 und 100 ng/ ml anti human CD3 stimuliert. Nach 4 h wurde den Kulturen Brefeldin A zugegeben. Die Zellen wurden nach 12 h mit PE-markiertem anti $\text{IFN}\gamma$ und FITC-markiertem anti CD4 bzw. anti CD8 getrennt oder in Kombination gefärbt. Es wurden die Prozentsätze der $\text{IFN}\gamma^+$ -Zellen für jede Zellpopulation ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen, die aus den Ergebnissen von vier unabhängigen Experimenten errechnet wurden.

4.2.2.3 ODN-Konzentration

Die nachgewiesenen indirekten Effekte der ODN auf T-Zellen wurden alle mit einer ODN-Konzentration von 2 μM erzielt. Um das Intervall der optimalen Wirkkonzentration einzugrenzen, wurden PBMZ mit unterschiedlichen Konzentrationen an 2006 und 10 ng/ml anti human CD3 stimuliert. Es wurden die CD69-Expression und IFN γ -Konzentration der Überstände gemessen. Abb. 12A und 12B zeigen die Ergebnisse dieser Titration. Optimale Stimulationsbedingungen erzielt man unter Verwendung von ODN-Konzentrationen zwischen 0.2 – 2 μM .

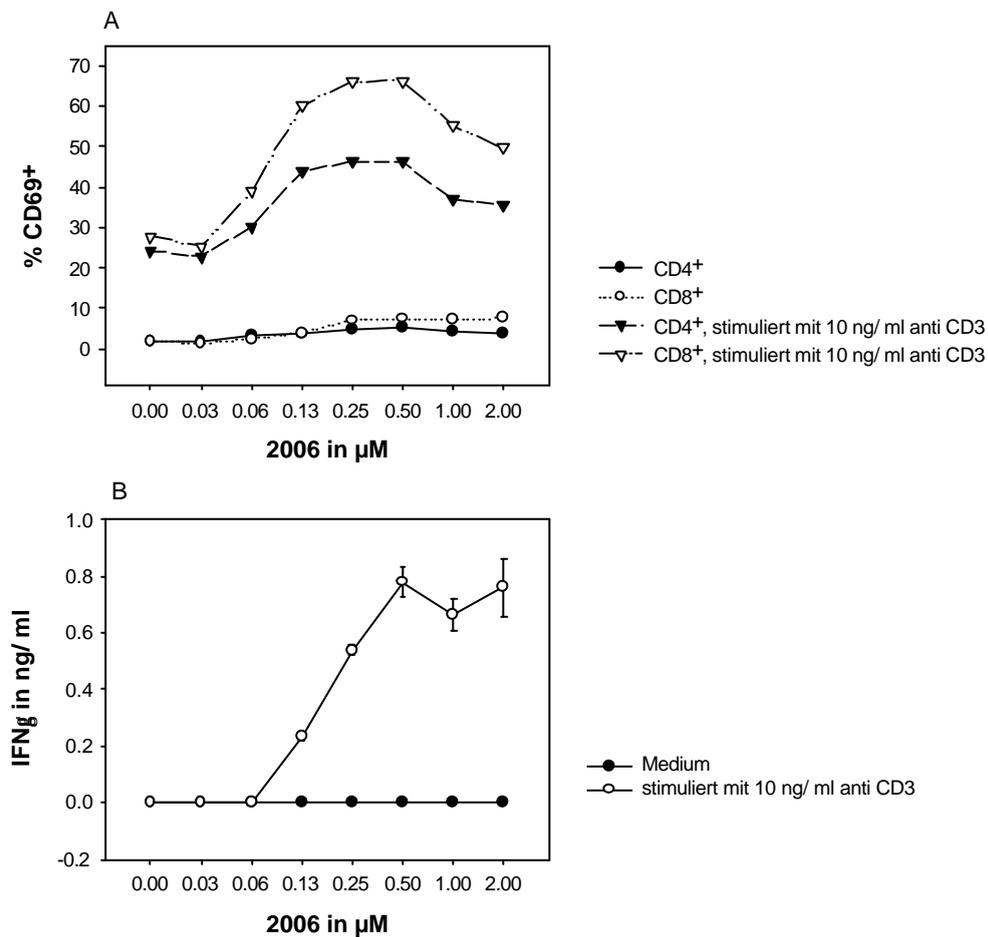


Abb. 12 Die CD69-Expression und die IFN γ -Produktion ist von der ODN-Konzentration abhängig:

5×10^6 PBMZ wurden mit Medium oder 10 ng/ml anti human CD3 und unterschiedlichen ODN-Konzentrationen stimuliert. Nach 24 h wurden die CD69-Expression der CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen (A) und die IFN γ -Konzentration der Überstände (B) gemessen.

4.2.3 Charakterisierung der indirekten Effekte der ODN auf T-Zellen

Die indirekten Effekte der ODN auf humane T-Zellen können durch lösliche Faktoren, durch Oberflächenmoleküle oder durch eine Kombination beider Mechanismen vermittelt werden. Als lösliche Faktoren, die in mit ODN stimulierten PBMZ induziert werden, kommen IL-12 (Bauer 1999) und IFN Typ I (Yamamoto 1994) in Frage. Sowohl IL-12 als auch IFN Typ I können die IFN γ -Produktion humaner Zellen induzieren (Gerosa 1996, Chehimi 1994, Rogge 1998). Außerdem ist bekannt, daß IFN Typ I zu einer CD69-Expression muriner T-Lymphozyten führt (Sun² 1998).

4.2.3.1 Transwell-System

Ein Transwell-System bietet die Möglichkeit die Beteiligung löslicher Faktoren zu untersuchen. Deswegen wurde dieses System mit der Zielsetzung verwendet zu überprüfen, ob durch CpG-ODN in PBMZ induzierte lösliche Faktoren zu einer Aktivierung von mit immobilisierten anti human CD3 stimulierten T-Lymphozyten führen.

Gereinigte humane T-Zellen wurden mit immobilisiertem anti human CD3 und 2006, 2006K bzw immobilisiertem anti human CD28, das als Kontrolle für die kostimulatorische Sensitivität des Systems eingesetzt wurde, stimuliert. Im selben Versuchsansatz erfolgte die Stimulation der durch immobilisiertes anti human CD3 aktivierten T-Zellen mit von PBMZ produzierten löslichen Faktoren, die durch die Poren der Membran des Transwell-Systems diffundieren konnten. Die sich im Transwell-Kultureinsatz befindlichen PBMZ wurden mit Medium, 2006 oder 2006K stimuliert. Die CD69-Expression wurde nach 24 h gemessen.

Die Ergebnisse des Experiments sind in Abb. 13 dargestellt. Anti human CD28 als Positivkontrolle führt verglichen mit den nur mit anti human CD3 stimulierten T-Zellen zu einer gesteigerten CD69-Expression, während die Zugabe von 2006 oder 2006K keinen Effekt auf die CD69-Expression hat. Anders verhält es sich mit den T-Lymphozyten, die mit PBMZ im Transwell-System kokultiviert wurden. Der Prozentsatz an CD69⁺-Zellen erhöht sich unter Stimulation mit 2006 verglichen mit den Prozentsätzen, die durch Stimulation mit 2006K bzw. mit Medium induziert werden.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß lösliche Faktoren an der indirekten Wirkung von ODN auf die CD69-Expression von T-Zellen beteiligt sind.

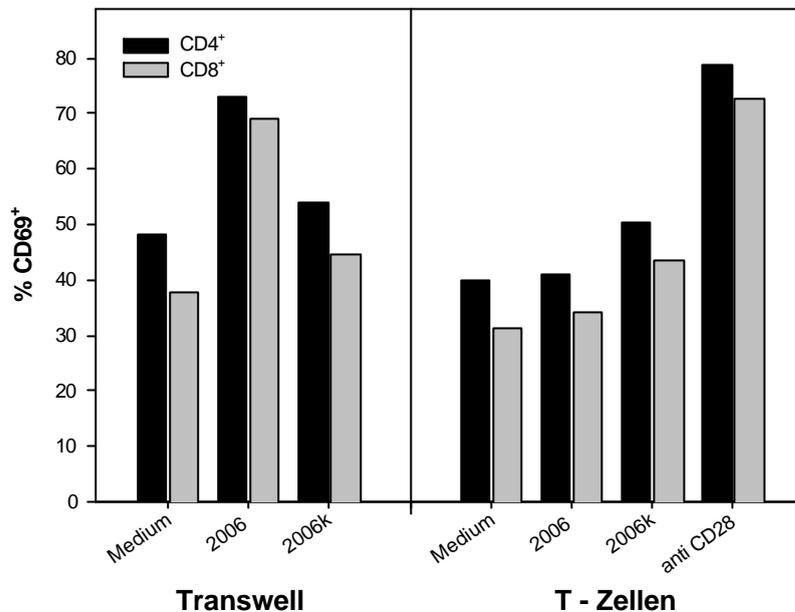


Abb. 13 Lösliche Faktoren, die von mit CpG-ODN stimulierten PBMZ produziert werden, induzieren auf durch anti human CD3 aktivierten gereinigten T-Lymphozyten CD69-Expression :

2×10^6 gereinigte T-Lymphozyten, stimuliert mit $0,8 \mu\text{g/ ml}$ immobilisiertem anti human CD3 wurden in einem Transwell-System zusammen mit PBMZ und Medium, 2006 bzw. 2006K kultiviert. Nach 24 h wurde die CD69-Expression für CD4⁺- und CD8⁺-Zellen getrennt ermittelt. Die Ergebnisse dieser Stimulationen sind im linken Teil der Abbildung dargestellt und tragen den Untertitel „Transwell“. Im rechten Teil der Abbildung ist die CD69-Expression nach 24-stündiger Stimulation von gereinigten T-Zellen mit $0,8 \mu\text{g/ ml}$ immobilisiertem anti human CD3 und Medium, 2006, 2006K und $4 \mu\text{g/ ml}$ immobilisiertem anti human CD28 dargestellt. Die Ergebnisse der so behandelten Zellen sind mit „T-Zellen“ untertitelt.

4.2.3.2 CpG-ODN induzierte IFN α -Produktion

Interferon Typ I fördert die Differenzierung von IFN γ produzierenden T_H1-Zellen (Rogge 1998) und induziert auf murinen T-Lymphozyten die Expression von CD69 (Sun² 1998). Deshalb wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen von PBMZ IFN Typ I produziert wird. Zu diesem Zweck wurden die IFN α -Konzentrationen von Überständen stimulierter PBMZ mittels Elisa bestimmt.

Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abb. 14 dargestellt.

Die Stimulation mit 2006 induziert eine IFN Typ I-Produktion. Unter Stimulation mit anti human CD3 in den Konzentrationen von 10 ng/ ml und 100 ng/ ml ist keine IFN α -Produktion nachweisbar. Die Kombination von anti human CD3 und 2006 bewirkt eine gesteigerte IFN α -Produktion (Faktor 5). Die Ausschüttung dieses Zytokins erfolgt CpG-abhängig, da das

Kontrolloligonukleotid AP1 weder alleine noch in Kombination mit einem T-Zellsignal zu einer detektierbaren IFN α -Produktion führt.

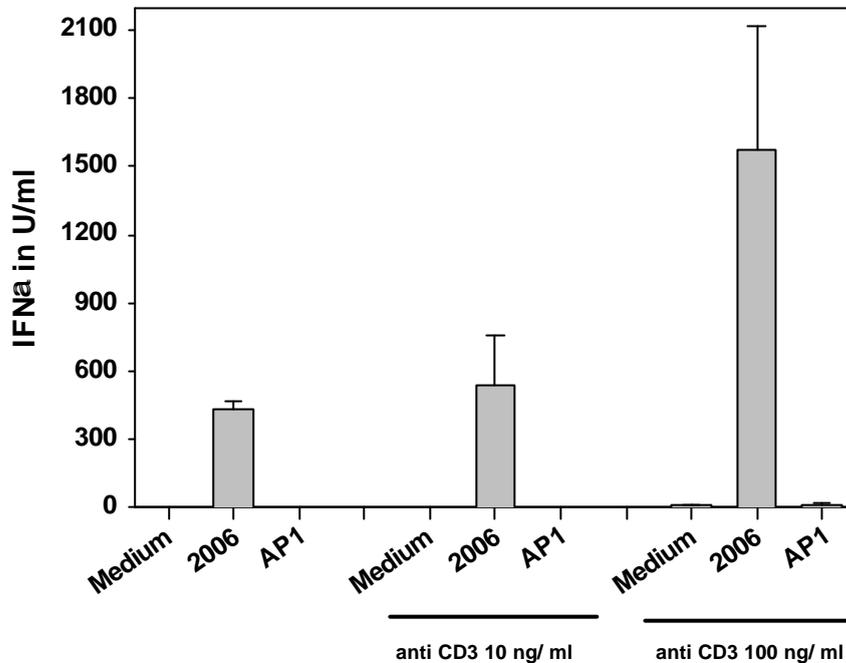


Abb. 14 Die Stimulation von PBMZ mit 2006 induziert IFN α -Produktion:

5×10^6 PBMZ wurden mit Medium, 2006, AP1 alleine oder in Kombination mit 10 ng/ ml oder 100 ng/ ml anti human CD3 stimuliert. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und die IFN α -Konzentration gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus Doppelbestimmungen.

4.2.3.3 Inhibition der ODN-Effekte durch neutralisierender Antikörper

Da gezeigt werden konnte, daß unter Stimulation von PBMZ mit CpG-ODN IFN α produziert wird und es bekannt ist, daß die Stimulation von PBMZ mit 2006 IL-12-Produktion induziert (Bauer 1999), stellte sich die Frage, ob die indirekten Effekte der CpG-ODN auf T-Zellen durch den Zusatz neutralisierender IFN Typ I- und IL-12-Antikörper blockierbar sind.

Untersucht wurde die Wirkung von anti IFN Typ I und anti IL-12 auf mit 2006 und 10 ng/ ml anti human CD3 stimulierter PBMZ unter dem Gesichtspunkt der CD69-Expression.

Wie Abb. 15 zeigt, verhindert die Neutralisation von IFN Typ I die durch 2006 induzierte Expression von CD69 sowohl innerhalb der CD4⁺- als auch der CD8⁺-Zellpopulationen.

Die Zugabe von anti IL-12 alleine oder in Kombination mit anti IFN Typ I hat keine Auswirkung auf die CD69-Expression.

Die Neutralisation von IFN Typ I bzw. IL-12 beeinflusst die durch niedrigdosiertes anti human CD3 (10 ng/ ml) induzierte CD69-Expression nicht (diese Ergebnisse sind nicht graphisch dargestellt).

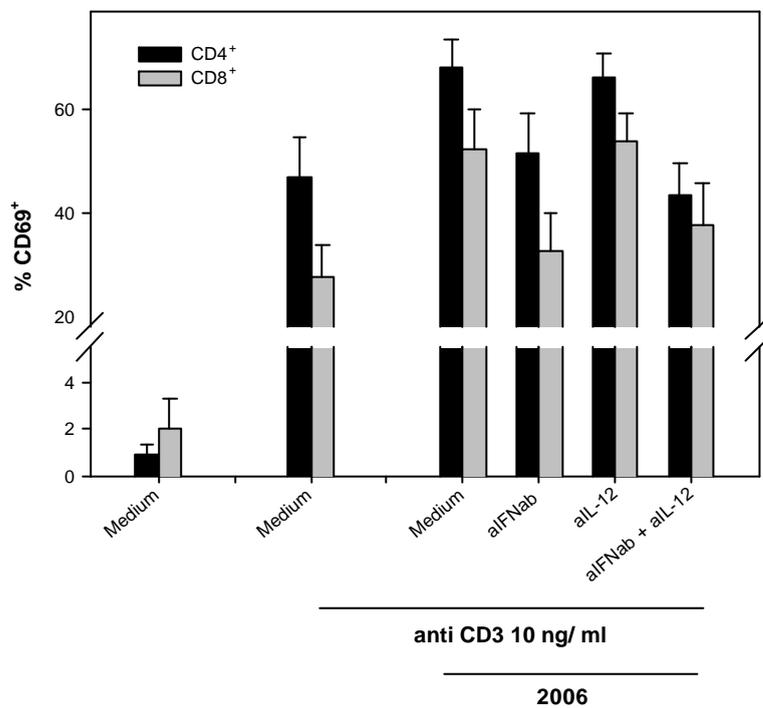


Abb. 15 Durch Zugabe von neutralisierendem IFN Typ I-Antikörper wird die durch anti human CD3 und CpG-ODN induzierte CD69-Expression gehemmt:

5x 10⁶ PBMZ wurden mit Medium, 10 ng/ ml anti human CD3 und 2006 stimuliert. Den mit 2006 und anti human CD3 stimulierten Kulturen wurden 500 U/ ml anti IFN Typ I (=aIFN ab), 2 µg/ ml anti IL-12 (=aIL-12) oder die Kombination der beiden Zytokin-Antikörper zugegeben. Nach 24 h wurden die Zellen mit anti CD69 und anti CD4 bzw. anti CD8 gefärbt. In der Abbildung sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt.

Auch der Einfluß der Neutralisation von IL-12 und IFN Typ I auf die IFN γ -Produktion in PBMZ-Kulturen, die mit 2006 und niedrigdosiertem anti human CD3 (10 ng/ ml) stimuliert wurden, wurde untersucht. Abb. 16 faßt die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten zusammen.

Die Neutralisation von IL-12 bzw. IFN Typ I führt zu einer verminderten IFN γ -Produktion, wobei die IFN Typ I-Neutralisation effektiver ist. Die kombinierte Zugabe beider Zytokin-Antikörper zu den PBMZ-Kulturen, senkt die IFN γ -Produktion auf Konzentrationswerte unterhalb der Nachweisgrenze des Elisa.

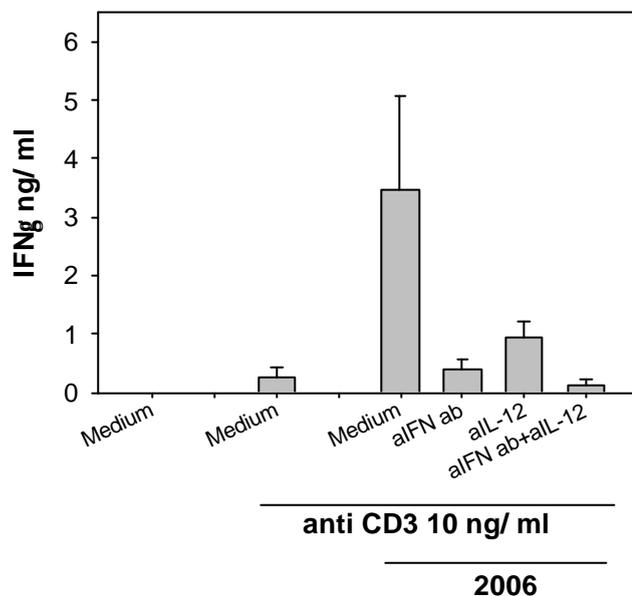


Abb. 16 Die IFN γ -Produktion, die durch Stimulation mit anti human CD3 und CpG-ODN induziert wird, kann durch neutralisierende IL-12- und IFN Typ I-Antikörper supprimiert werden;

5×10^6 PBMZ wurden mit Medium, 10 ng/ ml anti human CD3 und 2006 stimuliert. Den mit 2006 und anti human CD3 stimulierten Kulturen wurden 500 U/ ml anti IFN Typ I (=aIFN ab), 2 μ g/ ml anti IL-12 (=aIL-12) oder die Kombination der beiden Zytokin-Antikörper zugegeben. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und ihre IFN γ -Konzentration mittels Elisa bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwert und Standardabweichung errechnet aus vier unabhängigen Experimenten.

Um die Frage zu klären, ob die Zytokin-Antikörper auf einzelne IFN γ -produzierende Zellpopulationen mehr Wirkungen zeigen als auf andere, wurden intrazelluläre Färbungen von PBMZ, die mit 2006 und 10 ng/ ml anti human CD3 und neutralisierendem Antikörper stimuliert wurden, angefertigt.

Die Ergebnisse waren mit denen der Elisa-Messungen vergleichbar. Es konnten keine Unterschiede in der Wirkung der Antikörper auf spezielle Zellpopulationen festgestellt werden (siehe Abb. 17).

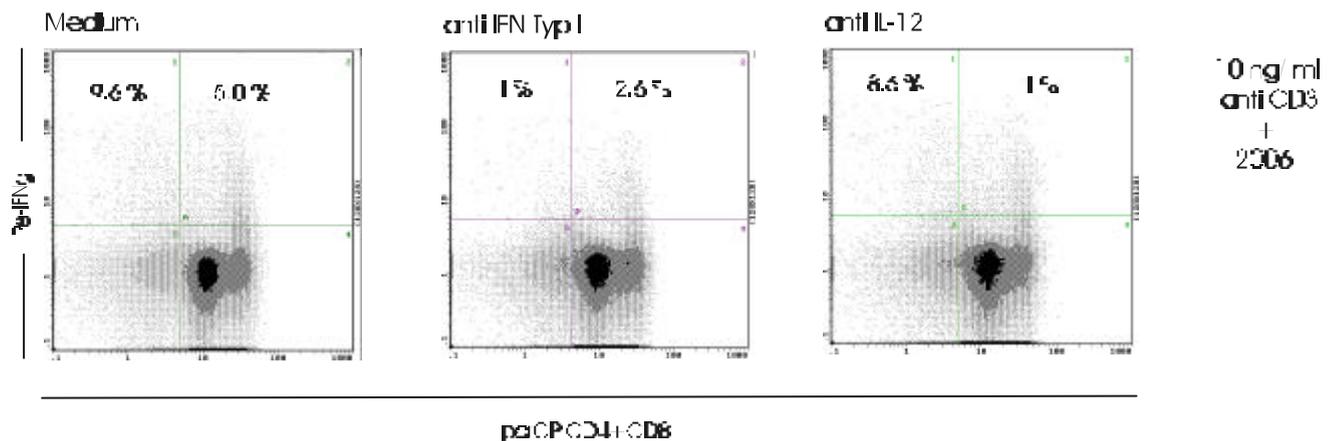


Abb. 17 Die IFN γ -Produktion, die durch die Stimulation mit anti human CD3 und CpG-ODN induziert wird, wird durch die Zugabe neutralisierender IL-12- und IFN Typ I-Antikörper innerhalb der CD4⁺-CD8⁺- und der CD4⁻/CD8⁻-Zellen supprimiert:

5x 10⁶ PBMZ wurden mit 2006 und 10 ng/ml anti human CD3 unter Zugabe von 2 μ g/ml anti IL-12 bzw. 500 U/ml anti INF Typ I kultiviert. Nach 4 h wurde den Kulturen Brefeldin A zugegeben. Nach weiteren 12 h wurden die Zellen mit PE-markiertem anti IFN γ und FITC-markiertem anti CD4 und anti CD8 gefärbt. In den dargestellten Histogrammen sind die Prozentsätze der IFN γ ⁺-Zellen bezogen auf die CD4⁺/CD8⁺-Zellpopulation bzw. auf die CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen angegeben.

4.2.3.4 Stimulation mit rekombinantem IL-12 und IFN Typ I

Es konnte gezeigt werden, daß die Zytokine IL-12 und IFN Typ I an den beschriebenen durch CpG-ODN induzierten indirekten Effekten auf T-Lymphozyten wesentlich beteiligt sind.

Um dies nochmals zu bestätigen, wurden PBMZ mit Medium oder niedrigdosiertem anti human CD3 und rekombinantem IL-12 bzw. IFN α stimuliert. Die Ergebnisse dieser Stimulation wurden mit denen der 2006-Stimulation verglichen.

CD69-Expression

Die CD69-Expression wurde durch die Zugabe von IFN α erhöht, im Gegensatz dazu hatte die Zugabe von IL-12 darauf keinerlei Einfluß. IFN α allein induzierte nur auf einem geringem Prozentsatz der T-Zellen eine CD69-Expression, während es innerhalb der B- und NK-Zellpopulationen eine effektiver Wirkung bezüglich des Prozentsatzes der CD69⁺-Zellen zeigte. Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit den durch 2006 induzierten Phänomenen. Die Ergebnisse der Stimulation mit 10 ng/ ml anti human CD3 und IFN α sind in Abb. 18 dargestellt. Der Prozentsatz der CD69⁺-Zellen steigt innerhalb der CD4-Helferzellen auf das 2,5-fache und innerhalb der CD8⁺-Zellen auf das 3-fache verglichen mit PBMZ, die nur mit anti human CD3 stimuliert wurden.

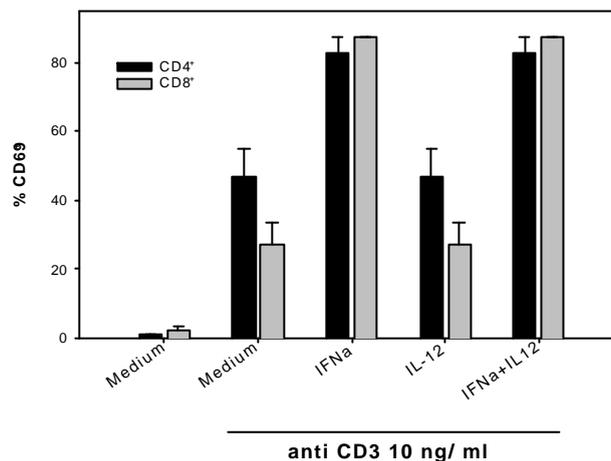


Abb. 18 Stimulation von PBMZ mit anti human CD3 und IFN α induziert eine CD69-Expression auf den T-Lymphozyten:

5x 10⁶ PBMZ wurden mit Medium, 10 ng/ ml anti human CD3 und 2 ng/ ml IL-12, 5000 U/ ml IFN α (=IFN α) und der Kombination beider Zytokine stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen mit anti CD69 und anti CD4 bzw. anti CD8 gefärbt. In der Abbildung sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt.

IFN γ -Produktion

Die IFN γ -Produktion wurde durch den Zusatz von rekombinanten IL-12 und IFN α zusammen mit 10 ng/ ml anti human CD3 zu PBMZ-Kulturen gesteigert. Die Steigerung konnte durch Bestimmung der IFN γ -Konzentrationen in Überständen wie auch auf Einzelzellniveau mittels intrazellulärer Färbungen nachgewiesen werden.

Abb. 19A und 19B zeigen die Ergebnisse dieser Versuche. Beide Zytokine können eine gesteigerte IFN γ -Produktion induzieren, sowohl innerhalb der T-Zellpopulation, wie auch innerhalb der CD4 $^+$ /CD8 $^-$ -Zellen

Diese Ergebnisse sind mit denen der 2006-Stimulation vergleichbar.

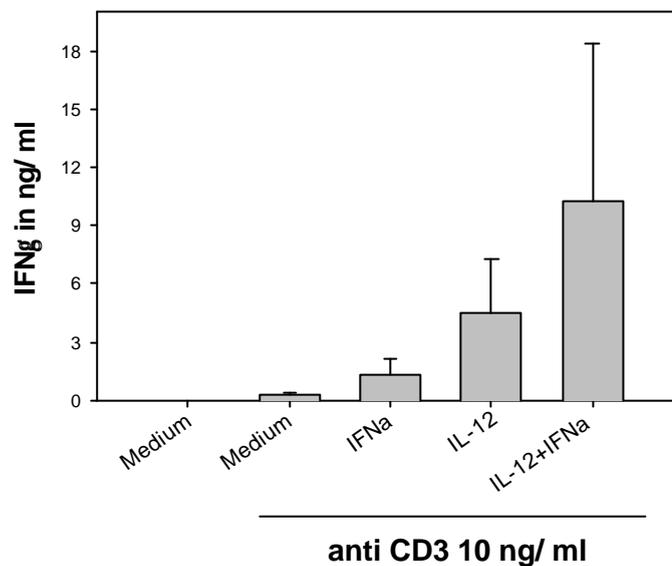


Abb. 19A Stimulation von PBMZ mit anti human CD3 und den rekombinanten Zytokinen IL-12 und IFN α steigert die IFN γ -Produktion:

5×10^6 PBMZ wurden mit Medium, 10 ng/ ml anti human CD3 und 2 ng/ ml IL-12, 5000 U/ ml IFN α (=IFN α) und der Kombination beider Zytokine stimuliert. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen. Die IFN γ -Konzentration der Überstände wurde mittels Elisa gemessen. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier unabhängigen Experimenten errechnet.

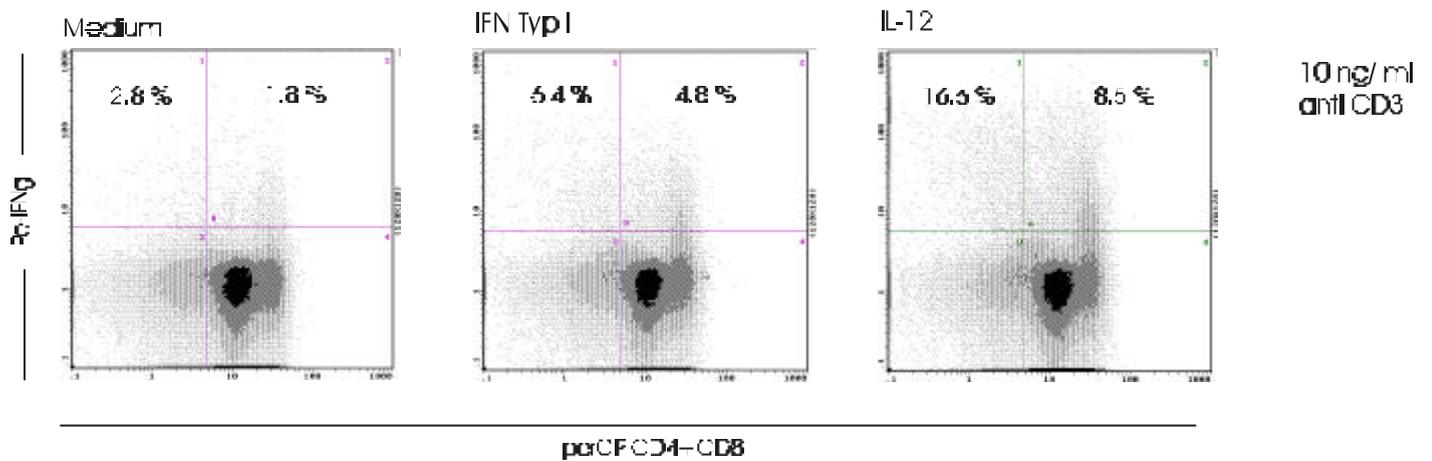


Abb. 19B Stimulation von PBMZ mit anti human CD3 und den rekombinanten Zytokinen IL-12 und IFN α steigert die IFN γ -Produktion sowohl innerhalb der CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen als auch innerhalb der CD4/CD8-Zellpopulation:

5x 10⁶ PBMZ wurden mit 10 ng/ml anti human CD3 und 2 ng/ml IL-12 bzw. 5000 U/ml IFN α stimuliert. Nach 4 h wurde den Kulturen Brefeldin A zugegeben. Nach weiteren 12 h wurden die Zellen mit PE-markiertem anti IFN γ und FITC-markiertem anti CD4 und anti CD8 gefärbt. In den dargestellten Histogrammen sind die Prozentsätze der IFN γ ⁺-Zellen bezogen auf die CD4/CD8⁺-Zellpopulation bzw. auf die CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen angegeben.

4.2.3.5 Überstandstransfer

Die Ergebnisse der Transwell-Versuche zeigen die Beteiligung löslicher Faktoren an den indirekten Effekten von CpG-ODN auf humane T-Lymphozyten unter Berücksichtigung der CD69-Expression.

Wie die Versuche mit neutralisierenden Antikörpern verdeutlichen, wird auch die Induktion der IFN γ -Produktion von löslichen Faktoren vermittelt. Um dies nochmals zu untermauern wurden Überstände von stimulierten PBMZ auf T-Zellblasten transferiert und die Induktion der IFN γ -mRNA nach 4 h mittels Realtime TaqMan-PCR analysiert.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 20 zusammengefasst. Der Transfer von Überständen unstimulierter oder mit AP1 stimulierter PBMZ induziert keine vermehrte Transkription von IFN γ . Auch die direkte Stimulation der T-Zellblasten mit 2006 bzw. mit

10 ng/ ml löslichem anti human CD3 führt nicht zu erhöhte IFN γ -mRNA-Werten.

Im Gegensatz dazu verachtfachen sich die Werte der IFN γ -mRNA-Transkripte nach Transfer von Überständen der mit 2006 stimulierten PBMZ, diese Induktion der IFN γ -mRNA ist vergleichbar mit der Induktion durch IL-12 .

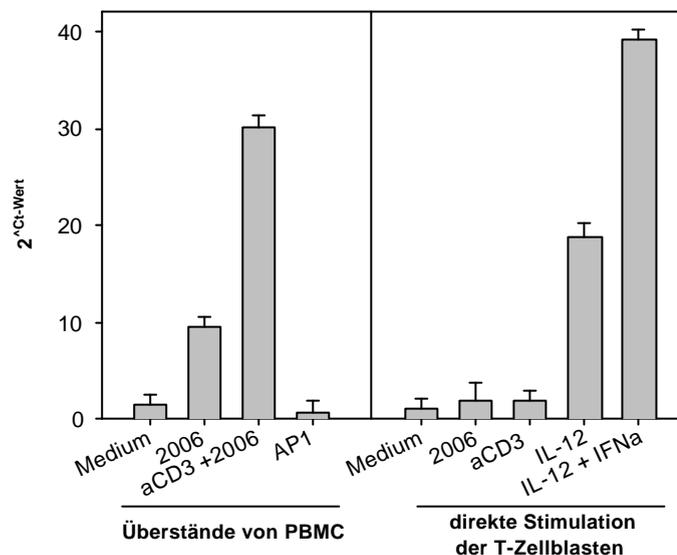


Abb. 20 Überstandstransfer von PBMZ, die mit CpG-ODN stimuliert wurden, auf T-Zellblasten induziert IFN γ -mRNA:

2x 10⁶ T-Zellblasten wurden mit Medium, 2006, 10 ng/ ml anti human CD3 (=aCD3), 2 ng/ ml IL-12 allein und zusammen mit 5000 U/ ml IFN α (=IFN α) direkt stimuliert. Die Ergebnisse dieser Stimulation sind im rechten Teil der Abbildung dargestellt und tragen den Untertitel „direkte Stimulation der T-Zellblasten“. Im linken Teil der Abbildung sind die Ergebnisse von 2x 10⁶ T-Zellblasten dargestellt, die mit den Überständen von PBMZ, die mit Medium, AP1, 2006 und der Kombination von 10 ng/ ml anti human CD3 (=aCD3) und 2006 für 24 h stimuliert worden waren, kultiviert wurden. Die Ergebnisse der so behandelte T-Zellblasten tragen den Untertitel „Überstände von PBMZ“.

Die T-Zellblasten wurden für 4 h stimuliert und die RNA der Zellen isoliert. Nach Transkription in cDNA wurden mittels Realtime Taqman-PCR die DCt-Werte für IFN γ ermittelt. Die Induktion der IFN γ -mRNA ist auf der y-Achse dargestellt, errechnet aus: 2^{-DcT-Wert}.

5 Diskussion

5.1 ODN zeigen keine kostimulatorische Wirkung auf gereinigte humane T-Lymphozyten.

ODN zeigen auf ruhende T-Zellen weder im murinen (Lipford¹ 1997) noch im humanen Immunsystem Effekte (die Ergebnisse wurden nicht explizit im Ergebnisteil gezeigt).

Anders verhält es sich mit der kostimulatorischen Wirkung von ODN auf T-Lymphozyten im Sinne eines Signal 2. Im murinen Immunsystem wirken ODN auf gereinigte T-Zellen dann kostimulatorisch, wenn sie zusammen mit immobilisiertem anti Maus CD3 als Signal 1 eingesetzt wurden. Diese kostimulatorische Wirkung wurde im Bezug auf Proliferation, IL-2-Produktion und Expression des IL-2-Rezeptors nachgewiesen. Sie bedarf keiner Interaktion mit CD28, da ODN auch auf T-Zellen aus CD28^{-/-}-Mäusen wirken (Bendigs 1999, Lipford¹ 1997). Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse mit gereinigten humanen T-Lymphozyten, daß eine kostimultorische Wirkung von ODN auf T-Zellen, die mit anti human CD3 bzw. anti human TZR als Signal 1 stimuliert wurden, nicht existiert.

Vielmehr konnte gezeigt werden, daß hohe Konzentrationen von G-reichen ODN die Aktivierung humaner T-Zellen auf der Ebene der Proliferation, der Regulation von Aktivierungsmarkern und der Zytokinproduktion hemmen. Diese Suppression hängt nicht mit einer zytotoxischen Wirkung der ODN zusammen, da weder eine Vorinkubation der T-Zellen mit den ODN noch eine verspätete Zugabe der ODN zu den T-Zellkulturen zur Hemmung der Proliferation führen.

Die Frage, warum murine und humane T-Zellen so unterschiedlich auf ODN reagieren, ist noch ungeklärt. Durch eine APZ-unabhängigen Kostimulation kann ein Organismus aber potentiell auch geschädigt werden. Einerseits ist die APZ-unabhängige T-Zellaktivierung vielleicht dann von Bedeutung, wenn Tumorzellen eliminiert werden sollen, die zwar Tumorantigene aber keine kostimulatorischen Oberflächenmoleküle exprimieren. Andererseits kann der Einsatz von ODN als T-Zelladjuvans zu einer APZ-unabhängigen Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten führen.

5.2 T-Zellen, die innerhalb eines PBMZ-Verbandes mit löslichem anti human CD3 als Signal 1 und CpG-ODN stimuliert werden, zeigen eine partielle Aktivierung.

Im murinen System konnte gezeigt werden, daß bakterielle DNA und CpG-ODN als Adjuvans wirken können. Die Adjuvansaktivität beinhaltet Proliferation von T-Zellen als Antwort auf Proteinantigene, $\text{INF}\gamma$ -Synthese, proteinspezifische CTL-Antworten und Produktion von $\text{T}_\text{H}1$ -orientierten Immunglobulin-Isotypen (Lipford¹ 1997, Sun¹ 1998, Roman 1997, Chu 1997). Der genaue Wirkmodus der bakteriellen DNA und der CpG-ODN, der zu einer klonalen Expansion antigenspezifischer T-Lymphozyten führt, ist noch unklar. In Erwägung zu ziehen sind zwei sich nicht ausschließende Möglichkeiten: einerseits indirekte Effekte auf T-Zellen durch die immunstimulierende Wirkung der CpG-ODN auf APZ, andererseits direkte Wirkung der CpG-ODN auf T-Zellen.

Im murinen System gibt es für die Existenz beider Wirkmodalitäten Hinweise. Die immunstimulierende Wirkung von bakterieller DNA und synthetischen CpG-ODN auf APZ im murinen System ist sowohl hinsichtlich der Produktion von Zytokinen wie z.B. IL-1, IL-6, IL-12, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\alpha$ ect. und der Expression kostimulatorischer Oberflächenantigene wie z.B. CD40 und B7.2 nachgewiesen (Lipford² 1997, Stacey 1996, Sparwasser 1997, Sato 1996, Sparwasser 1998). Ein Beispiel für APZ-abhängige indirekte Effekte der ODN auf murine T-Zellen ist Induktion der CD69-Expression CD8⁺-Zellen 18 h nach Injektion von CpG-ODN bzw. nach über Nacht Kultur von unseparierten Milzzellen mit CpG-ODN. Das durch CpG-ODN in APZ induzierte $\text{IFN}\alpha$ scheint für die Induktion der CD69-Expression eine Rolle zu spielen (Sun² 1998). Wie schon im ersten Abschnitt der Diskussion aufgeführt, gibt es auch Ergebnisse die zeigen, daß eine direkte Wirkung der ODN auf T-Zellen im Sinne einer Kostimulation im murinen System existiert (Bendigs 1999).

Für das humane Immunsystem konnte eine direkte kostimulatorische Wirkung der ODN auf T-Zellen nicht nachgewiesen werden (siehe 5.1). Es ist aber bereits gezeigt, daß bakterielle DNA und CpG-ODN immunstimulierend auf APZ wirken. Bakterielle DNA und CpG-ODN induzieren innerhalb der APZ-Population die Produktion von Zytokinen z.B. IL-12, IL-6 und $\text{IFN}\alpha$ und die Expression von Oberflächenmolekülen wie CD86, CD40, HLA-DR und HLA-ABC (Bauer 1999, Yamamoto 1994).

Die in der vorliegenden Dissertation dargestellten Ergebnisse zeigen, daß auch im humanen System APZ-abhängige indirekte Effekte der CpG-ODN auf T-Zellen existieren. Allerdings

sind diese Effekte, anders als im murinen System, abhängig von der Stimulation der T-Zellen über den T-Zellrezeptor im Sinne eines Signal 1, da bei alleiniger Stimulation der PBMZ mit CpG-ODN keine CD69-Expression der CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen gemessen werden kann.

Die Aktivierung der T-Zellen durch CpG-ODN und anti human CD3 kann mit der von Sun beschriebenen partiellen Aktivierung der murinen T-Zellen verglichen werden (Sun² 1998). Es ist berechtigt, die durch CpG-ODN ausgelöste gesteigerte CD69-Expression als partielle Aktivierung zu bezeichnen, da sie nicht mit einer gleichzeitigen vermehrten CD25-Expression einhergeht. Für eine erfolgreiche T-Zellaktivierung z.B. über den T-Zellrezeptor und CD28 muß die T-Zelle in den Zellzyklus eintreten, um klonal zu expandieren. Für diesen Prozeß ist es erforderlich, daß eine gleichzeitige Synthese des IL-2-Rezeptors, dieser entspricht dem Oberflächenantigen CD25, und des Wachstumsfaktors IL-2 stattfindet. Eine Induktion eines dieser beiden Ereignisse der T-Zellaktivierung durch indirekte Effekte von CpG-ODN konnte nicht nachgewiesen werden.

Die durch CpG-ODN induzierter Aktivierung der humanen mit anti human CD3 teilaktivierten T-Zellen wurde durch IFN Typ I vermittelt. Dies konnte durch neutralisierende Antikörper, durch die Zugabe von rekombinantem IFN α und durch den Nachweis von IFN α in den Überständen der Kulturen gezeigt werden.

Die Bedeutung von IFN α im Zusammenhang mit indirekten durch CpG-ODN ausgelösten Effekten auf T-Zellen wurde im murinen System in vivo und vitro gezeigt (Sun² 1998). Im Unterschied zum murinen System, wo deutlich eine bevorzugte Wirkung des durch CpG-ODN induzierten IFN α auf die CD8⁺-Zellpopulation gezeigt wurde, ist die prozentuale Zunahme der CD69-Expression innerhalb der CD4⁺-Zellen im humanen System mit der innerhalb der CD8⁺-Zellpopulation vergleichbar.

Um nochmals darauf einzugehen, daß im murinen Immunsystem eine T-Zellrezeptor unabhängige partielle Aktivierung der T-Zellen durch IFN α möglich ist und IFN α sogar zu einer in vivo Proliferation von CD8⁺-Gedächtniszellen führt (Tough 1997, Zhang 1998), sei an dieser Stelle angemerkt, daß die Stimulation von humanen PBMZ mit 5000 U/ ml IFN α zu einer moderaten CD69-Expression der CD8⁺-Zellen mancher Spender führte (diese Ergebnisse wurden nicht explizit im Ergebnisteil gezeigt). Eine solche CD69-Expression der CD8⁺-Zellen innerhalb der mit CpG-ODN stimulierten PBMZ konnte nie beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß die eingesetzte Konzentration des rekombinanten IFN α (5000 U/ ml) ein Vielfaches der IFN α -Konzentrationen betrug, die in den Überständen der mit CpG-ODN stimulierten PBMZ ermittelt wurden.

Offen ist im Moment noch die Frage, ob die durch IFN Typ I induzierte CD69-Expression einen direkten Effekt des IFN Typ I auf die T-Zellen widerspiegelt und ob sie sowohl auf naiven T-Lymphozyten als auch auf T-Gedächtniszellen zu finden ist.

Diese Frage ist vor allem deshalb von Interesse, weil im murinen System gezeigt wurde, daß ein Teil der durch IFN α induzierten Effekte auf T-Zellen wie die Proliferation von CD8⁺-Gedächtniszellen über IL-15 vermittelt wird (Zhang 1998). Hingegen führt das durch CpG-ODN induzierte IFN α zu einer CD69-Expression sowohl innerhalb der naiven T-Zellen als auch der T-Gedächtniszellen (Sun² 1998). Deswegen erscheint es unwahrscheinlich, daß die sekundäre IL-15-Produktion, deren Zielzellen CD8⁺-Zellen des Gedächtnisphänotyps sind, auch für diesen Effekt verantwortlich ist.

5.3 Die Stimulation von PBMZ mit löslichem anti human CD3 und CpG-ODN induziert IFN γ -Produktion in T-Lymphozyten und NK-Zellen.

Es ist bekannt, daß in humanen PBMZ durch ODN eine IFN γ -Produktion induziert wird (Yamanoto 1994, Ballas 1996, Roman 1997). Die IFN γ -Produktion stammt von NK-Zellen (Ballas 1996, Bohle 1999, Iho 1999) und ist zum Teil IL-12 vermittelt (Ballas 1996). Diese Ergebnisse konnten in den Versuchen der vorliegenden Dissertation bestätigt werden. CpG-ODN induzierten in PBMZ eine geringe IFN γ -Produktion. Durch intrazelluläre IFN γ -Färbungen konnten die NK-Zellen als IFN γ -Produzenten charakterisiert werden.

Die Ergebnisse der Stimulation von PBMZ mit CpG-ODN und anti human CD3 zeigen, daß durch den Synergismus zwischen CpG-ODN und T-Zellrezeptorsignal die IFN γ -Produktion um ein Vielfaches gesteigert werden kann. Die IFN γ -produzierenden Zellen sind hauptsächlich CD8⁺-Zellen und CD4⁻/CD8⁻-Zellen. Weitere Differenzierungen, z.B. Färbung mit anti CD16, legen die Vermutung nahe, daß es sich bei den IFN γ -produzierenden CD4⁻/CD8⁻-Zellen um NK-Zellen handelt. Man findet nur einen geringen Prozentsatz IFN γ ⁺-Zellen innerhalb der CD4⁺-Zellpopulation.

Durch Einsatz neutralisierender Antikörper, durch Zugabe rekombinanten IL-12 und IFN α und durch Bestimmung der IFN α -Konzentration in Überständen stimulierter PBMZ konnte gezeigt werden, daß die erhöhte IFN γ -Produktion durch IFN Typ I und IL-12 vermittelt wird.

IFN γ ist ein Zytokin, das für eine T_H1-Antwort charakteristisch ist. Es ist bekannt, daß IL-12 wie auch IFN Typ I in T-Zellen eine IFN γ -Produktion induzieren und zu einer T-Zelldifferenzierung in Richtung einer T_H1-Immunantwort führen (Rogge 1998, Chehimi 1994, Sareneva 1998).

Es wurde bereits im murinen System gezeigt, daß die Verwendung von CpG-ODN als Adjuvans in vivo zu einer T_H1-Immunantwort führt (Roman 1997) bzw. daß Leishmanien infizierte Mäuse durch Injektion von CpG-ODN therapiert werden können, indem die destruierende T_H2-Immunantwort in eine kurative T_H1-Immunantwort konvertiert wird (Zimmermann 1998). Auch im humanen System können CpG-ODN in der Anwesenheit von APZ eine Differenzierung von T-Zellen zu T_H1-Zellen induzieren (Bauer, unveröffentlicht).

Bei den Versuchen, die im Zuge dieser Dissertation durchgeführt wurden, handelt es sich um Kurzzeitkulturen. D.h. man kann die IFN γ -Produktion – gemessen nach maximal 24 h – nicht als eine Differenzierung der T-Zellen betrachten. Dafür spricht auch, daß nur ein geringer Teil des IFN γ von CD4⁺-Zellen produziert wird, wobei natürlich auch hier von Interesse wäre, ob es sich dabei um T-Gedächtniszellen handelt. Der weitaus größte Teil des IFN γ stammt von CD8⁺-Zellen bzw. NK-Zellen.

Dennoch ist die Anwesenheit von IFN γ während einer Immunantwort wichtig. Zum einen verstärkt IFN γ im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus die IL-12-Produktion von Makrophagen (Chehimi 1994, Gerosa 1996, Ma 1996), die wiederum die Differenzierung der T-Zellen in Richtung T_H1-Immunantwort fördert, andererseits gibt es Ergebnisse, die den Schluß nahelegen, daß IFN γ bei der Differenzierung der T-Lymphozyten im Sinne des T_H1/T_H2-Modells einen direkten Einfluß hat (Schmitt¹ 1994).

Deswegen ist die Potentierung der IFN γ -Produktion durch die gemeinsame Stimulation mit anti human CD3 und CpG-ODN ein wichtiges Ereignis auf dem Weg zu einer T_H1-Immunantwort. Man weiß schon lange, daß IL-12 die Produktion von IFN γ vorallem in NK-Zellen induziert (Chehimi 1994, Trinchieri 1996). Auch von IFN Typ I ist bekannt, daß es die IFN γ -Produktion von T-Zellen steigert (Sareneva 1998, Rogge 1998). Allerdings handelt es sich bei den meisten Versuchen, in denen die Wirkung von IFN Typ I auf T-Zellen untersucht wird, um Langzeitkulturen, die die T_H1-Differenzierung zum Ziel haben bzw. in einigen Versuchen werden T-Zellblasten verwendet. Die kurzzeitige Wirkung von IFN Typ I zusammen mit einem T-Zellrezeptorstimulus in PBMZ-Kulturen wurde in dieser Weise noch nicht näher untersucht. Es wurde gezeigt, daß IFN Typ I eine IFN γ -Produktion in gereinigten CD4⁺-Zellkulturen, die gleichzeitig mit immobilisiertem anti human CD3 stimuliert wurden, induziert, während die nach demselben Stimulationsprotokoll behandelten gereinigten CD8⁺-

Zellen kein IFN γ produzieren (Brinkmann 1993). Diese Ergebnisse scheinen auf den ersten Blick im Widerspruch zu den in dieser Dissertation vorgestellten Daten. Man muß aber – ähnlich wie bei der CD69-Expression – die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß IFN Typ I zu einer sekundären Zytokinproduktion der APZ führen könnte, welche wiederum stimulierend auf die T-Zellen wirken könnte.

Insgesamt wirken in dem hier vorgestellten Versuchsmodell viele Faktoren synergistisch oder additiv zusammen, die sich gegenseitig beeinflussen können und so vielleicht in manchen Punkten mit der in vivo Situation vergleichbar werden.

5.4 CpG-ODN können in Zukunft vielleicht als Adjuvans therapeutisch genutzt werden.

Bei alleiniger Verabreichung von Proteinen sind diese nur schwach immunogen. Eine adaptive Immunantwort erfordert, daß das Antigen in einem Gemisch, dieses wird als Adjuvans bezeichnet, injiziert wird. Adjuvantien besitzen meist zwei Eigenschaften, die die Immunogenität der Proteinen verstärken, zum einen wandeln sie lösliche Proteinantigene in partikuläres Material um zum anderen beinhalten sie mikrobielle Bestandteile, die eine bessere präsentatorische Aktivität der APZ bewirken. Diese mikrobiellen Bestandteile induzieren starke lokale Entzündungsreaktionen, die die Anwendung beim Menschen ausschließen.

Ein solches Adjuvans ist das vollständige Freund'sche Adjuvans (CFA), dessen gemeinsame Injektion mit einem Antigen zu einer T_H1-dominierten Immunantwort führt. Auf Grund der unerwünschten entzündlichen Nebenwirkungen kann es bei humanen Impfstoffen keine Verwendung finden. Das CFA ist eine Öl-in-Wasser-Emulsion mit toten Mykobakterien und es gibt Hinweise, daß die APZ-stimulierenden Effekte des CFA auf immunstimulierende mykobakterielle DNA zurückzuführen sind (Freund 1937, Yamamoto¹ 1992). Durch in vivo Versuche in der Maus konnte gezeigt werden, daß CpG-ODN auch als Adjuvans eingesetzt werden können (Lipford¹ 1997, Chu 1997, Roman 1997). Die CpG-ODN induzieren ähnlich dem CFA eine starke T_H1-Immunantwort ohne die heftigen lokalen Entzündungsreaktionen auszulösen wie sie für CFA typisch sind. Ein Modell zur Erklärung der Adjuvanswirkung von CpG-ODN, das die bereits bekannten Effekte der CpG-ODN im Maussystem mitberücksichtigt, ist in Abb. 21 dargestellt.

Da viele Vakzine gegen Viren, sei es inaktivierte Viren oder virale Untereinheiten, eine typische T_H2 -Immunantwort mit hohen Titern an neutralisierenden Antikörpern, aber ohne signifikante zellvermittelte Immunität induzieren, scheint es vor allem in diesem Falle erstrebenswert CpG-ODN als Adjuvans einzusetzen. Der Einsatz von CpG-ODN bei der Immunisierung könnte sowohl auf der humoralen als auch auf der zellulären Ebene eine wirkungsvolle Immunität ermöglichen.

Unter diesen Gesichtspunkten wurde versucht in der hier vorliegenden Dissertation ein Modell zu entwickeln, um auch im humanen System *in vitro* die Möglichkeiten einer Adjuvanswirkung von CpG-ODN zu untersuchen. Bei der kombinierten Stimulation mit anti human CD3 und CpG-ODN kam dem anti human CD3 die Rolle des Antigens zu, das im Falle einer Immunisierung durch APZ präsentiert wird und so zu einer T-Zellrezeptorligation führt. Die Ergebnisse zeigen, daß die Stimulation des T-Zellrezeptors zusammen mit CpG-ODN zu einer Stimulation der T-Zellen führt, die sich allem Anschein nach in Richtung T_H1 differenzieren.

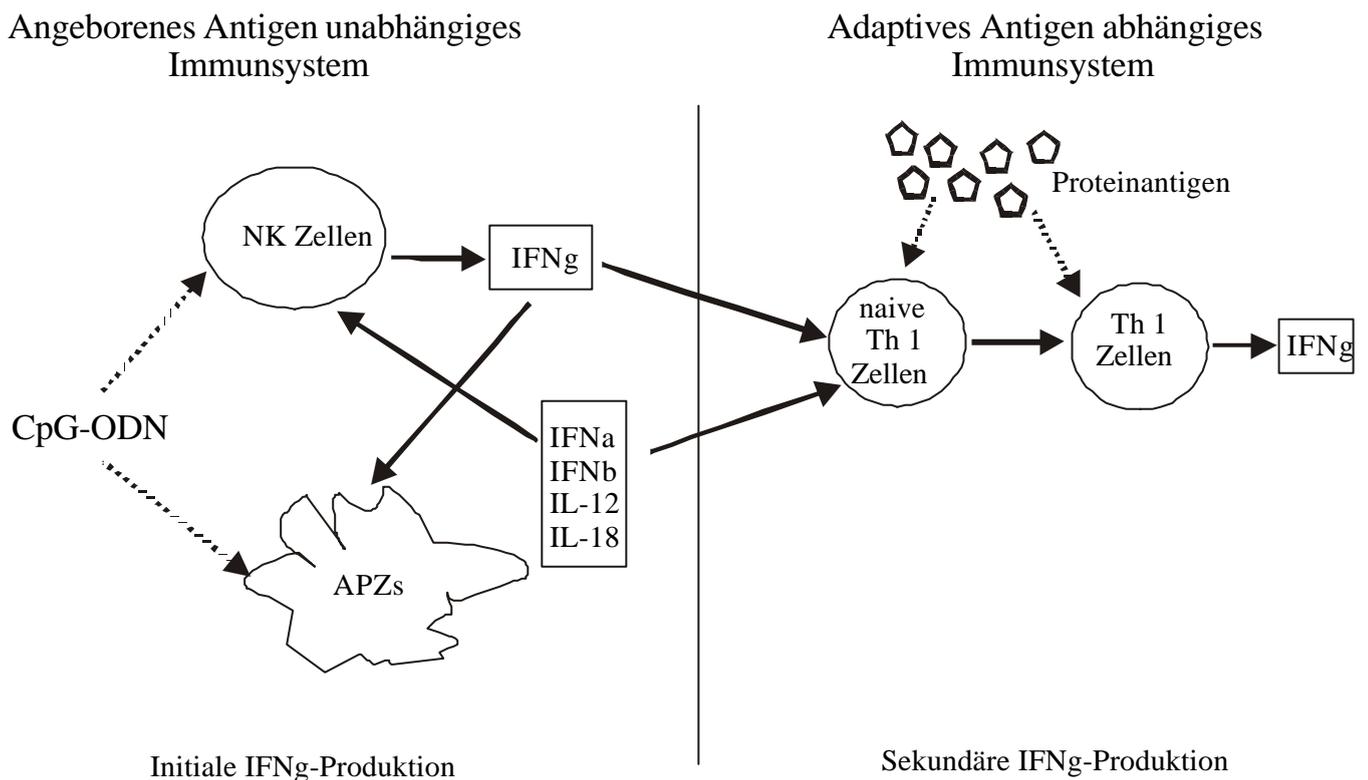


Abb. 21 Modell zur Erklärung der Adjuvanswirkung von CpG-ODN:

CpG-ODN wirken direkt stimulatorisch auf NK-Zellen und APZ und induzieren die Produktion von Zytokinen (IFN α , IFN β , IFN γ , IL-12 und IL-18), die im Sinne einer positiven Rückkopplung auf die Freisetzung von Zytokinen wirken und die naiven T-Zellen im Sinne einer T_H1 -Antwort stimulieren.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die direkten und indirekten Effekte immunstimulatorischer CpG-ODN auf humane T-Lymphozyten untersucht.

Eine kostimulatorische Wirkung der CpG-ODN auf gereinigte humane T-Zellen, die gleichzeitig mit immobilisiertem anti human CD3 oder anti human TZR stimuliert wurden, konnte nicht gezeigt werden.

Im Gegensatz dazu induzierten die CpG-ODN sequenzspezifisch eine vermehrte CD69-Expression auf CD4- und CD8-T-Zellen, wenn diese in Anwesenheit von APZ mit löslichem anti human CD3 stimuliert wurden. Die Stimulation von PBMZ mit löslichem anti human CD3 und CpG-ODN wirkte synergistisch bezüglich der IFN α -Produktion von T-Zellen und NK-Zellen. Dies konnte durch intrazelluläre IFN α -Färbungen nachgewiesen werden.

Die CpG-ODN induzierte CD69-Expression konnte in einem Transwell-System durch Kokultivierung von gereinigten humanen T-Zellen und PBMZ reproduziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, daß der Überstandstransfer von mit CpG-ODN stimulierten PBMZ auf humane T-Zellblasten zu einer vermehrten Transkription von IFN α führt.

Als lösliche Faktoren, die für die Effekte der CpG-ODN auf humane T-Zellen und NK-Zellen verantwortlich sind, konnten IFN α und IL-12 identifiziert werden. Durch die Neutralisation von IFN α mit Hilfe von Antikörpern konnte die CpG-ODN induzierte CD69-Expression gehemmt werden. Auch die CpG-ODN vermittelte IFN α -Produktion der T-Zellen und NK-Zellen konnte durch den Einsatz von IFN α - und IL12-Antikörpern supprimiert werden.

Die Stimulation der PBMZ mit anti human CD3 und rekombinantem IFN α und IL-12 zeigten bezüglich der CD69-Expression und der IFN α -Produktion ähnliche Ergebnisse wie die Stimulation mit CpG-ODN.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, daß CpG-ODN die TZR vermittelte Aktivierung humaner T-Lymphozyten in APZ abhängiger Weise potentieren können.

7 Literaturverzeichnis

- Ballas, Z. K., Rasmussen, W. L. und 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
- Banchereau, J. und Steinmann, R.M.
Dendritic Cells and the Control of Immunity
Nature, 392 (1998) 245-252
- Bauer, M., Heeg, K., Wagner, H. und Lipford G. B.
DNA Activates Human Immune Cells through a CpG Sequence-Dependent Manner
Immunology, 97 (1999) 699-705
- Baroja, M. L., Lorre, K., Van Aaeck, F. und Ceuppens, J. L.
The Anti-T Cell Monoclonal Antibody 9.3 (Anti-CD28) Provides a Helper Signal and
Bypasses the Need for Accessory Cells in T Cell Activation with Immobilized Anti-CD3 and
Mitogens
Cellular Immunology 120 (1989) 205-217
- Belosevic, M., Finbloom, D. S., Van Der Meide, P. H., Slayter, M. V. und Nacy, C. A.
Administration of Monoclonal Anti-IFN γ Antibodies in Vivo Abrogates Natural Resistance of
C3H/HeN Mice to Infection with Leishmania Major
J. Immunol. 143 (1989) 266-274
- Bendigs, S., Salzer, U., Lipford, G. B., Wagner, H. und Heeg, K.
CpG-Oligodeoxynucleotides Co-Stimulate Primary T Cells in the Absence of Antigen-
Presenting Cells
Eur. J. Immunol. 29 (1999) 1209-1218
- Bentley, G. A. und Mariuzza, R. A.
The Structure of the T Cell Antigen Receptor
Annu. Rev. Immunol. 14 (1996) 563-590
- Beverly, P. C.
CD45 Isoform Expression: Implication for Recirculation of Naive and Memory Cells
Immunol. Res. 10 (1991) 196-198
- Bird, A. P.
CpG-rich Islands and the Function of DNA Methylation
Nature 321 (1986) 209-213
- Biron, C. A.
Role of Early Cytokines, Including Alpha and Beta Interferons (IFN- α/β), in Innate and
Adaptive Immune Responses to Viral Infections
Sem. Immunol. 10 (1998) 383-390

- Brinkmann, V., Geiger, T., Alkan, S. und Heusser, C. H.
Interferon Increases the Frequency of Interferon-Producing Human CD4⁺ T Cells
J. Exp. Med. 178 (1993) 1655-1663
- Bohle, B., Jahn-Schmid, B., Maurer, D., Kraft, D. und Ebner, C.
Oligodeoxynucleotides Containing CpG Motifs Induce IL-12, IL-18 and IFN Gamma
Production in Cells from Allergic Individuals and Inhibit IgE Synthesis in Vitro
Eur. J. Immunol. 29 (7) (1999) 2344-2353
- Buelens, C., Verhasselt, V., De Groote, D., Thielemans, K., Goldman, M. und Willems, F.
Human Dendritic Cell Responses to Lipopolysaccharide and CD40 Ligation are Differentially
Regulated by Interleukin-10
Eur. J. Immunol. 27 (1997) 1848-1852
- Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I. und Lanzavecchia, A.
Maturation, Activation, and Protection of Dendritic Cells Induced by Double-Stranded RNA
J. Exp. Med. 189 (1999) 821-829
- Cehimi, J. und Trinchieri, G.
Interleukin-12: a Bridge Between Innate Resistance and Adaptive Immunity with a Role in
Infection and Acquired Immunodeficiency
J. Clin. Immunol. 14 (3) (1994) 149-161
- Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V. und Harding, C. V.
CpG Oligodeoxynucleotides Act as Adjuvants that Switch on T Helper 1 (Th1) Immunity
J. Exp. Med. 186 (1997) 1623-1631
- Clement, L. T.
Functional and Phenotypic Properties of 'Naive' and 'Memory' CD4⁺ T Cells in the Human
Immunol. Res. 10 (1991) 189-195
- Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M. und Strober, W.
Current Protocols in Immunology 1996
- Craston, R., Koh, M., Mc Dermontt, A., Ray, N., Prentice, H. G. und Lowdell, M. W.
Temporal Dynamics of CD69 Expression on Lymphoid Cells
J. Immunol. Methods 209 (1) (1997) 37-45
- De Kimpe, S. R., Kengatharan, M., Thiemermann, C. und Vane, J. R.
The Cell Wall Components Peptidoglycan and Lipoteichoic Acid from *Staphylococcus*
Aureus Act in Synergy to Cause Shock and Multiple Organ Failure
Proc. Natl. Acad. Sci. 92 (1995) 10359-10363
- Dustin, M. L. und Springer, T. A.
Role of Lymphocyte Adhesion Receptors in Transient Interactions and Cell Locomotion
Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 27-66
- English, B. K., Patrick, C. C., Orlicek, S. L., McCordic, R. und Shenep, J. L.
Lipoteichoic Acid from Viridans Streptococci Induces the Production of Tumor Necrosis
Factor and Nitric Oxide by Murine Macrophages
J. Infect. Dis. 174 (1996) 1348-1351

- Freund, J., Casals, J. und Hosmer, E. P.
Sensitization and Antibody Formation After Injection of Tubercle Bacilli and Paraffin Oil
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 37 (1937) 509-513
- Gerosa, F., Paganin, C., Peritt, D., Paiola, F., Scupoli, M. T., Aste-Amezaga, M., Frank, I. und Trinchieri, G.
Interleukin-12 Primes Human CD4 and CD8 T Cell Clones for High Production of Both Interferon-Gamma and Interleukin-10
J. Exp. Med. 183 (6) (1996) 2559-2569
- Gilfillan, S., Benoist, C. und Mathis, D.
Mice Lacking Terminal Deoxynucleotidyl Transferase: Adult Mice with a Fetal Antigen Receptor Repertoire
Immuol. Rev. 148 (1995) 201-219
- Greenberg, J. W., Fischer, W. und Joiner, K. A.
Influence of Lipoteichoic Acid Structure on Recognition by the Macrophage Scavenger Receptor.
Infect. Immun. 64 (1996) 3318-3325
- Häcker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptary, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Lipford, G. B. und 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 Journal 17 (1998) 6230-6240
- Haynes, B. F. und Hale, L. P.
The Human Thymus. A Chimeric Organ Comprised of Central and Peripheral Lymphoid Components
Immunol. Res. 18 (1998) 175-192
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Warson, R. und Gelfand, D. H.
Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5'-3' Exonuklease Activity of *Thermus Aquaticus* DNA Polymerase
Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991) 7276-7280
- Iho, S., Yamamoto, T., Takahashi, T. und Yamamoto, S.
Oligodeoxynucleotides Containing Palindrome Sequences with Internal 5'-CpG-3' Act Directly on Human NK and Activated T Cells to Induce INF- γ Production in Vitro
J. Immunol. 163 (1999) 3642-3652
- Inaba, K., Pack, M., Inaba, M., Sakuta, H., Isdell, F. und Steinmann, R. M.
High Levels of a Major Histocompatibility Complex II-Self Peptide Complex on Dendritic Cells from the T Cell Areas of Lymph Nodes
J. Exp. Med. 186 (1997) 665-672
- Jacob, T., Walker, P. S., Krieg, A. M., von Stebut, E., Udey, M. C., und Vogel, J., C.
Bacterial DNA and CpG-Containing Oligodeoxynucleotides Activates Cutaneous Dendritic Cells and Induce IL-12 Production: Implications for the Augmentation of Th1 Responses
Int. Arch. Allergy Immunol. 118 (1999) 457-461

Janeway, C. A., Carding, S., Jones, B., Murray, J., Portoles, P., Rasmussen, R., Rojo, J. Saizawa, K., West, J. und Bottomly, K.
CD4⁺ T Cells: Specificity and Function
Immunol. Rev. 101 (1988) 39-80

Janeway, C. A. und Travers, P.
Immunologie
3. Auflage (1997)

Janeway, C. A. und Medzhitov, R.
Introduction: The Role of Innate Immunity in the Adaptive Immune Response
Sem. Immunol. 10 (1998) 349-350

Jensen, K. E., Neal, A. L., Owens, R. E. und Warren, J.
Interferon Responses of Chick Embryo Fibroblasts to Nucleic Acids and Related Compounds
Nature 200 (1963) 433-434

Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R., M. und Nussenzweig, C.
The Receptor DEC-205 Expressed by Dendritic Cells and Thymic Epithelial Cells Is Involved in Antigen Processing
Nature 375 (1995) 151-155

Krieg, A. M., Yi, A., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. und Klinman, D. M.
CpG Motifs in Bacterial DNA Trigger direct B-Cell Activation
Nature 374 (1995) 546-549

Lang, R., Pfeffer, K., Wagner, H. und Heeg, K.
A Rapid Method for Semiquantitative Analysis of the Human V α -Repertoire Using TaqMan PCR
J. Immunol. Methods 203 (1997) 181-192

Lang, R. und Heeg, K.
Semiquantitative Determination of Human Cytokine mRNA Expression Using TaqMan RT-PCR
Inflammopharmacology 6 (1998) 297-309

Lang, R., Hültner, L., Lipford, G. B., Wagner, H. und Heeg, K.
Guanosine-Rich Oligodeoxynucleotides Induce Proliferation of the Macrophage Progenitors in Cultures of Murine Bone Marrow Cells
Eur. J. Immunol. 29 (1999) 3496-3506

Lenschow, D. L., Walunas, T. L. und Bluestone, J. A.
CD28/B7 System of T Cell Costimulation
Annu. Rev. Immunol. 14 (1996) 233-258

Lipford¹, G.B., Bauer, M., Blank, C., Reiter R., Wagner, H. und Heeg, K.
CpG-Containing Synthetic Oligonucleotides Promote B and Cytotoxic T Cell Responses to Protein Antigen: a New Class of Vaccine Adjuvans
Eur. J. Immunol. 27 (1997) 2340-2344

- Lipford², G.B., Sparwasser, T., Bauer, M., Zimmermann, S., Koch, E.-S., Heeg, K. und Wagner, H.
Immunostimulatory DNA: Sequence-Dependent Production of Potentially Harmful or Useful Cytokines
Eur. J. Immunol. 27 (1997) 3420-3426
- Lipford, G. B., Heeg, K. und Wagner, H.
Bacterial DNA as Immune Cell Activator
Trends in Microbiology 6 (1998) 496-500
- Lo, D., Feng, L., Cason, M. J., Crowley, M., Pauza, M., Nguyen, A. und Reilly, C. R.
Integrating Innate and Adaptive Immunity in the Whole Animal
Immunol. Rev. 169 (1999) 225-239
- Ma, X., Chow, J. M., Gri, G., Carra, G., Gerosa, F., Wolf, S. F., Dzialo, R. und Trinchieri, G.
The Interleukin 12p40 Gene Promoter is Primed by Interferon Gamma in Monocytic Cells
J. Exp. Med. 183 (1996) 147-157
- Macfarlane, D. E. und Manzel, L.
Antagonism of Immunostimulatory CpG-Oligodeoxynucleotides by Quinacrine, Chloroquine, and Structurally Related Compounds
J. Immunol. 160 (1998) 1122-1131
- Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M. G., Piccini, M., Maggi, E., Trinchieri, G. und Romagnani, S.
Natural Killer Cell Stimulatory Factor (Interleukin 12 [IL-12]) Induces T Helper Type I (Th1)-specific Immune Responses and Inhibits the Development of IL-4-Producing Th Cells
J. Exp. Med. 177 (1993) 1199-1204
- Mashiba, H., Tomoda, H. und Furusawa, M.
In Vitro Augmentation of Macrophage-Activating-Factor Release from Peripheral Blood Cells of Cancer Patients by a DNA Fraction from Mycobacterium Bovis BCG.
Jpn. J. Med. Sci. Biol. 43 (1990) 133-139
- Medema, J. P. und Borst, J.
T Cell Signaling: a Decision of Life and Death.
Hum. Immunol. 60 (1999) 403-411
- Medzhitov, R. und Janeway, C. A.
Innate Immunity: Impact on the Adaptive Immune Response
Curr. Opin. Immunol. 9 (1997) 4-9
- Medzhitov, R. und Janeway, C. A.
An Ancient System of Host Defense
Curr. Opin. Immunol. 10 (1998) 12-15
- Moll, H., Fuchs, H., Blank, C. und Röllinghoff, M.
Langerhans Cells Transport Leishmania Major from the Infected Skin to the Draining Lymph Node for the Presentation to Antigen-specific T Cells
Eur. J. Immunol. 23 (1993) 1595-1601

Moingeon, P. E., Lucich, J. L., Stebbins, C. C., Recny, M. A., Wallner, B. P., Koyasu, S. und Reinherz, E. L.

Complementary Roles for CD2 and LFA-1 Adhesion Pathways During T Cell Activation
Eur. J. Immunol. 21 (1991) 605-610

Mosmann, T. R. und Sad, S.

The Expanding Universe of T-Cell Subsets: Th1, Th2 and More.
Immunol. Today 17 (1996) 138-146

Muraille, E. und Leo, O.

Revisiting the Th1/Th2 Paradigm
Scand. J. Immunol. 47 (1998) 1-9

Reiner, S. L. und Seder, R. A.

T Helper Cell Differentiation in Immune Response
Curr. Opin. Immunol. 7 (1995) 360-366

Res, P. und Spits, H.

Developmental Stages in the Human Thymus
Semin. Immunol. 11 (1999) 39-46

Rogers, P. R., Huston, G. und Swain, S. L.

High Antigen Density and IL-2 Are Required for Generation of CD4 Effectors Secreting Th1 Rather Than Th0 Cytokines
J. Immunol. 161 (1998) 3844-3852

Rogge, L., D'Ambrosio, D., und Biffi, M.

The Role of Stat4 in Species-Specific Regulation of Th Cell Development by Type I IFNs
J. Immunol. 161 (1998) 6567-6574

Roman, M., Martin-Orozco, E., Goodman, J. S., Nguyen, M.-D., Sato, Y., Ronaghy, A., Kornbluth, R. S., Richmann, D.D., Carbson, D. A. und Raz, E.

Immunostimulatory DNA Sequences Function as T Helper-1-Promoting Adjuvants
Nature Medicine 3 (1997) 849-854

Sallusto, F. und Lanzavecchia, A.

Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor α
J. Exp. Med. 179 (1994) 1109-1118

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. und Lanzavecchia, A.

Dendritic Cells Use Macropinocytosis and the Mannose Receptor to Concentrate Macromolecules in the Major Histocompatibility Complex Class II Compartment: Downregulation by Cytokines and Bacterial Products
J. Exp. Med. 182 (1995) 389-400

Sareneva, T., Matikainen, S., Kurimoto, M. und Julkunen, I.

Influenza A Virus-Induced IFN and IL-18 Synergistically Enhance IFN Gene Expression in Human T Cells
J. Immunol. 160 (1998) 6032-6038

Sato, Y., Roman, M. und Tighe, H.
Immunostimulatory DNA Sequences Necessary for Effective Intradermal Gene Immunization
Science 273 (1996) 352-354

Schmitt¹, E., Hoehn, P., Huels, C., Goedert, S., Palm, N., Rude, E. und Germann, T.
T Helper Type 1 Development of Naive CD4⁺ T Cells Requires the Coordinate Action of Interleukin-12 and Interferon-Gamma and is Inhibited by Transforming Growth Factor-Beta
Eur. J. Immunol. 24 (1994) 793-798

Schmitt², E., Hoehn, P., German, T. und Rude, E.
Differential Effects of Interleukin-12 on the Development of Naive Mouse CD4⁺ T Cells
Eur. J. Immunol. 24 (1994) 343-347

Schwartz, R. H.
Models of T Cell Anergy: Is There A Common Molecular Mechanism?
J. Exp. Med. 184 (1996) 1-8

Seder, R. A., Paul, W. E., Davis, M. M. und Fazekas de St. Groth, B.
The Presence of Interleukin 4 during In Vitro Priming Determines the Lymphokine-Producing Potential of CD4⁺ T Cells from T Cell Receptor Transgenic Mice
J. Exp. Med. 176 (1992) 1091-1098

Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shan, K., Ho, S., Antonenko, S. und Liu, Y. J.
The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood.
Science 284 (1999) 1835-1837

Sparwasser, T., Miethke, T. und Lipford, G. B.
Makrophages Sense Pathogens via DNA Motifs: Induction of Tumor Necrosis Factor-Alpha-Mediated Shock
Eur. J. Immunol. 27 (1997) 1671-1679

Sparwasser, T., Koch, E.-S., Vabulas, R. M., Heeg, K., Lipford, G. B., Ellwart, J. und Wagner, H.
Bacterial DNA and Immunostimulatory CpG Oligonucleotides Trigger Maturation and Activation of Murine Dendritic Cells
Eur. J. Immunol. 28 (1998) 2045-2054

Stacey, K. J., Sweet, M. J. und Hume, D. A.
Macrophages Ingest and Are Activated by Bacterial DNA
J. Immunol. 157 (1996) 2116-2122

Stein, C. A., Subasinghe, C., Shinozuka, K. und Cohen, J. S.
Physicochemical Properties of Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides
Nucleic Acids Res. 16 (1988) 3209-3221

Sun¹, S., Kishimoto, H. und Sprent, J.
DNA as an Adjuvant: Capacity of Insect DNA and Synthetic Oligodeoxynucleotides to Augment T Cell Responses to Specific Antigen
J. Exp. Med. 187 (1998) 1145-1150

- Sun², S., Zhang, X., Tough, D. F. und Sprent, J.
Type I Interferon-Mediated Stimulation of T Cells by CpG DNA
J. Exp. Med. 188 (1998) 2335-2342
- Sypek, J. P., Chung, C. L., Mayor, S. E. H., Subramanyam, J. M., Goldman, S. J., Sieburth, D. S., Wolf, S. F. und Schaub, R. G.
Resolution of Cutaneous Leishmaniasis: Interleukin 12 Initiates a Protective T Helper Type 1 Immune Response
J. Exp. Med. 177 (1993) 1797-1802
- Taborsky, I. und Dolnik, V.
Ability of Human Polymorphonuclear Blood Cells to Produce Interferon after Induction with Phage Double-Stranded RNA
Acta Virol. 21 (1977) 499-502
- Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T., Makiguchi, N. und Suganuma, T.
Antitumor Activity of Deoxyribonucleic Acid Fraction From Mycobacterium Bovis BCG. I. Isolation, Physicochemical Characterization and Antitumor Activity
J. Natl. Cancer Res. 72 (1984) 955-962
- Tokunaga, T., Yano, O., Kuramoto, E., Kimura, Y., Yamamoto, T., Kataoka, T. und Yamamoto, S.
Synthetic Oligonucleotides with Particular Base Sequences from cDNA Encoding Proteins of Mycobacterium bovis BCG Induce Interferons and Activate Natural Killer Cells
Microbiol. Immunol. 36 (1992) 55-66
- Tough, D.F., Sun, S. und Sprent, J.
T Cell Stimulation In Vivo by Lipopolysaccharide (LPS)
J. Exp. Med. 185 (1997) 2089-2094
- Trinchieri, G und Gerosa, F.
Immunoregulation by Interleukin-12
J. of Leukocyte Biology 59 (1996) 505-511
- Ulevitch, R. J. und Tobias, P. S.
Recognition of Gram-Negative Bacteria and Endotoxin by the Innate Immune System
Curr. Opin. Immunol. 11 (1999) 19-22
- Wang, C., Bogue, M., Roth, D. und Meek, K.
Normal Junctional Diversification of Immune Receptors in p53-Deficient Mice
J. Immunol. 159 (1997) 757-762
- Weiner, G. J., Liu, H. M., Woolbridge, J. E., Dahle, C. E. und Krieg, A. M.
Immunostimulatory Oligodeoxynucleotides Containing the CpG Motif are Effective as Immune Adjuvants in Tumor Antigen Immunization
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 94 (1997) 10833-10837
- Wu, C.-Y., Demeure, C., Kiniwa, M., Gately, M und Delespesse, G.
IL-12 Induces the Production of INF γ by Neonatal Human CD4 T Cells
J. Immunol. 151 (1993) 1938-1949

- Yamamoto, S., Kuramoto, E., Shimada, S. und Tokunaga, T.
 In Vitro Augmentation of Natural Killer Cell Activity and Production of Interferon-alpha/beta and γ with Deoxyribonucleic Acid Fraction from Mycobacterium Bovis BCG.
 Jpn. J. Cancer Res. 79 (1988) 866-873
- Yamamoto¹, S., Yamamoto, T., Shimada, S., Kuramoto, E., Yano, O., Kataoka, T. und Tokunaga, T.
 DNA from Bacteria, but Not from Vertebrates, Induces Interferons, Activates Natural Killer Cells and Inhibits Tumor Growth
 Microbiol. Immunol. 36 (9) (1992) 983-997
- Yamamoto², S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O. und Tokunaga, T.
 Unique Palindromic Sequences in Synthetic Oligonucleotides are Required to Induce INF and Augment INF-Mediated Natural Killer Activity
 J. Immunol. 148 (1992) 4072-4076
- Yamamoto, T., Yamamoto, S., Kataoka, T., Komuro, K., Kohase, M. und Tokunaga, T.
 Synthetic Oligonucleotides with Certain Palindromes Stimulates Interferon Production of Human Peripheral Blood Lymphocytes in Vitro
 Jpn. J. Cancer Res. 85 (1994) 775-779
- Yi, A., Tuetken, R., Redford, T., Waldschmidt, M., Kirsch, J. und Krieg, A. M.
 CpG Motifs in Bacterial DNA Activate Leukocytes Through the pH-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species
 J. Immunol. 160 (1998) 4755-4761
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F. und Sprent, J.
 Potent and Selective Stimulation of Memory-Phenotype CD8⁺ T Cells In Vivo by IL-15
 Immunity 8 (1998) 591-599
- Ziegler, S. F., Levin, S. D., Johnson, L., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Baker, E., Sutherland, G. R., Feldhaus, A. L. und Ramsdell, F.
 The Mouse CD69 Gene. Structure, Expression, and Mapping to the NK Gene Complex
 J. Immunol. 152 (3) (1994) 1228-1236
- Zimmermann, S., Egeter, O., Hausmann, S., Lipford, G. B., Röcken, M., Wagner, H. und Heeg, K.
 CpG Oligodeoxynucleotides Trigger Protective and Curative Th1 Responses in Lethal Murine Leishmaniasis
 J. Immunol. 160 (1998) 3627-3630

Danksagung:

Mein Dank richtet sich an erster Stelle an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hermann Wagner, der es mir ermöglichte in seinem Institut diese Doktorarbeit durchzuführen und mich während dieser Arbeit unterstützte. Gleichmaßen gilt mein Dank Dr. Roland Lang, der mir in allen Fragen zur Seite stand; beispielhaft sei erwähnt, daß er immer wieder nach nicht informativen Experimenten mit mir nach Problemlösungen suchte und mich sehr zeitintensiv praktisch und theoretisch unterstützte.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Institutes: Sylvia Bendigs und Susanne Hausmann haben mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Dr. Stefan Bauer und Peter Hochholzer haben durch Hilfsbereitschaft und zeitfordernden Einsatz mir die Arbeit sehr erleichtert. Die Zusammenarbeit mit Marc Bauer habe ich sehr geschätzt.

Schlußendlich bedanke ich mich bei meinen Freunden außerhalb des Labors, insbesondere bei Mirjam Fuchs und Florian Hennhöfer und bei meiner Familie für Ihr Verständnis für meine häufige Abwesenheit.

Vielen, vielen Dank!

Katharina Kranzer