

III. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ. – Prof. Dr. Chr. Peschel)

Einfluß der Stimulation mit CpG-Oligodesoxynukleotiden und Kostimulation mit CpG-Oligodesoxynukleotiden und IL-2 auf Proliferation, Zytokinproduktion und Expression von Oberflächenmolekülen bei B-CLL-Zellen

Manuela Kronschnabl

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. Chr. Peschel
2. Priv. – Doz. Dr. H. Bernhard

Die Dissertation wurde am 11.07.02 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.11.02 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	5
II	Einleitung	8
1.	Chronisch lymphatische Leukämie	8
	1.1 Klinische Erscheinungen	8
	1.2 Pathophysiologische Hintergründe	9
2.	IL-2 und IL-2-Rezeptor	11
3.	CpG-DNA	12
4.	Bedeutung der Oberflächenmoleküle CD 40, CD 54, CD 58, CD 80, CD 86, MHC-Klasse I und MHC-Klasse II	15
III	Materialien	18
1.	Laborgeräte	18
2.	Chemikalien	19
3.	Lösungen	21
4.	Fluorochrommarkierte Antikörper	23
5.	PCR-Primer	23
6.	Oligonukleotide und Zytokine	23
7.	Plastikwaren	24
8.	Untersuchungsmaterialien	24
IV	Methoden	25
1.	Zellbiologische Methoden	25
	1.1 Zellseparationsmethoden	25
	1.1.1 Isolierung mononukleärer Zellen (PBMC) aus peripherem Blut durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	25
	1.1.2 Zellzählung	26
	1.1.3 Immunomagnetische Separation von B-Zellen aus PBMC	27

1.1.3.1	Isolierung von B-CLL-Zellen	27
1.1.3.2	Separation von B-Zellen bei Normalpersonen	28
1.2	Kulturbedingungen	29
1.3	Proliferationsassay	31
1.4	Analyse von Oberflächenstrukturen mittels Durchflußzytometrie	31
2.	ELISAs zur Bestimmung von IL-6, TNF α und Ig M	32
2.1	IL-6- und TNF α -ELISA	33
2.2	IL-8-ELISA	35
2.3	Ig M-ELISA	35
3.	Molekularbiologische Methoden	36
3.1	RNA-Isolierung mit TRI ^R -Reagenz	36
3.2	Quantifizierung und Reinheitsbestimmung der isolierten DNA	38
3.3	Reverse Transkription von Gesamt-RNA	39
3.4	Polymerasekettenreaktion mit cDNA	40
3.5	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	43
4.	Statistische Auswertung	44
V	Ergebnisse	46
1.	Reinheit der isolierten Zellpopulationen	46
2.	Expression von Oberflächenmolekülen	46
2.1	FACS-Analyse nach Stimulation mit DSP 30 bzw. Kostimulation mit DSP 30 und IL-2	47
2.1.1	CD 25-Expression	47
2.1.2	CD 40-Expression	48
2.1.3	CD 54-Expression	49
2.1.4	CD 58-Expression	49
2.1.5	CD 80-Expression	50
2.1.6	CD 86-Expression	50
2.1.7	MHC-Klasse I-Expression	51
2.1.8	MHC-Klasse II-Expression	51
2.1.9	Vergleich der MFIR verschiedener CD-Moleküle nach Stimulation mit DSP 30 und IL-2	52
2.2	FACS-Analyse nach alleiniger Stimulation von B-Zellen mit	

	IL-2	53
2.3	FACS-Analyse nach Stimulation mit Kontrolloligonukleotiden	54
3.	Proliferation von B-Zellen nach Stimulation	55
4.	Produktion von Immunglobulin M und den Zytokinen IL-6, TNF α und IL-8	56
4.1	Ig M-Synthese nach Stimulation	56
4.2	IL-6-Synthese nach Stimulation	57
4.3	TNF α -Synthese nach Stimulation	58
4.4	IL-8-Synthese nach Stimulation	59
5.	Ergebnisse der RT-PCR	59
5.1	β -Aktin – PCR	59
5.2	IL-6 – PCR	61
5.3	TNF α – PCR	61
VI	Diskussion	63
1.	Expression von Oberflächenmolekülen nach Stimulation	63
2.	Proliferation	68
3.	Immunglobulin- und Zytokinsynthese	69
4.	Therapeutische Möglichkeiten	71
VII	Zusammenfassung	74
VIII	Literaturverzeichnis	76

I Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AIHA	Autoimmunhämolytische Anämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AP-1	Activating Protein-1

B

BCG	Bacille Calmette-Guérin
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	Basenpaare

C

C	Cytosin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
cpm	counts per minute

D

dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
------	--------------------------

F

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

G

G	Guanin
g	Gramm

I

ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN	Interferon

IL	Interleukin
ITP	Immunthrombozytopenie
J	
Jak	Janus-Kinase
L	
l	Liter
LPS	Lipopolysacharide
LFA-1	Leukocyte Function Associated Antigen 1
M	
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MFIR	Mean Fluorescence Intensity Ratio
MFIRI	Mean Fluorescence Intensity Ratio Induction
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
N	
NF-KB	Nuclear Factor K B
NHL	Non Hodgkin Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
O	
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotide
Oligo(dT)	Oligodesoxythymidylsäure
P	
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCD	Programmed Cell Death
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PTK	Proteintyrosinkinase
Pu	Purin
Py	Pyrimidin
R	
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
S	
SAC	Staphylokokkenantigen Cowan I
SEM	Standard Error of the Mean
sIg	Surface Immunoglobulin
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T	
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan

T _m	Schmelztemperatur
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
U	
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	
V	Volt
vgl.	vergleiche
Z	
z. B.	zum Beispiel

II Einleitung

1. Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

1.1 Klinische Erscheinungen

Die chronisch lymphatische Leukämie ist die häufigste Leukämieform in der westlichen Hemisphäre. Es handelt sich um eine Erkrankung des höheren Lebensalters, das durchschnittliche Alter zum Diagnosezeitpunkt liegt bei 55 Jahren. Männer sind etwa doppelt so häufig wie Frauen betroffen. Die CLL ist charakterisiert durch klonale Expansion immuninkompetenter B-Lymphozyten (95 %) mit verlängerter Überlebenszeit. Nur in 3 Prozent der Fälle kommt es zu einer Akkumulation von malignen T-Zellen (Rai und Patel, 1993, S. 1308).

Unter Zuhilfenahme von Parametern wie Lymphozytenzahl, Ausmaß der Knochenmarksinfiltration, Anzahl der betroffenen Lymphknotenregionen und der Erythrozyten- und Thrombozytenzahl im peripheren Blut können nach Rai und Binet verschiedene Krankheitsstadien eingeteilt werden, die mit durchschnittlichen Überlebenszeiten von zwei bis zu über zehn Jahren einhergehen (Rai et al., 1975, S. 219, Binet et al., 1981, S. 198). Prognostisch günstig zu bewerten sind eine Blutlymphozytenverdopplungszeit von mehr als zwölf Monaten, noduläres im Gegensatz zu diffusem Knochenmarksinfiltrationsmuster und ein normales Karyotyp der Lymphozyten (Foon und Gale, 1990, S. 789).

Kompliziert wird die Erkrankung durch Autoimmunphänomene wie autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) oder Immuntrombozytopenie (ITP) bei bis zu 10 Prozent der Patienten (Rai und Patel, 1993, S. 1309, Ebbe et al., 1962, S. 23) aber auch durch Infektionen bei Hypogammaglobulinämie, die mit Progredienz der Erkrankung bei nahezu jedem Betroffenen zu finden ist (Foon und Gale, 1990, S. 785, Fernandez et al., 1968, S. 767).

Als Ursache für die sich letztlich bei fast allen Patienten entwickelnde Hypogammaglobulinämie wird diskutiert, daß die maligne Zellpopulation an sich eine

Barriere für die normale Antikörperproduktion darstellt, indem B-CLL-Zellen die T-Helfer-Zell-abhängige Aktivierung von normalen B-Zellen behindern (Kneitz et al., 1999, S. 98). Allerdings kommen auch andere Ursachen für eine Hypogammaglobulinämie in Frage, bei CLL-Patienten findet man z. B. eine Umkehr der T-Helfer-T-Suppressor-Zell-Ratio (Kay et al., 1981, S. 418).

Bedingt durch den meist protrahierten und lange Zeit asymptomatischen Verlauf der CLL ist die Indikation zur Therapie erst bei schwerer Anämie, Thrombozytopenie oder symptomatischer Lymphadenopathie bzw. Splenomegalie gegeben, auch weil die derzeit zur Verfügung stehenden Mittel eine kurative Behandlung nicht ermöglichen (Rai und Patel, 1993, S. 1314, French Cooperative Group on CLL, 1990, S. 1414). Therapieform der Wahl ist die Chemotherapie, wobei meist eine Kombination aus einer alkylierenden Substanz (Chlorambucil) mit Kortikosteroiden zum Einsatz kommt (O'Brien et al., 1995, S. 308). Neue Therapieformen mit dem Purinanalogon Fludarabin (Keating et al., 1989, S. 19) oder Rituxan, einem chimären monoklonalen Antikörper, der gegen CD 20 gerichtet ist (O'Brien, et al., 1999, S. 603), sind derzeit in Erprobung. Als weitere Therapieoptionen kommen die allogene Knochenmarkstransplantation, speziell bei Patienten unter 50 Jahren (Bandini et al., 1991, S. 251), sowie die autologe Stammzelltransplantation (Montserrat et al., 1999, S. 397) in Betracht.

Phänotypisch zeichnen sich B-CLL-Zellen durch geringe Mengen an Oberflächenimmunglobulin, meist der Klasse IgM oder IgD sowie mindestens einem der B-Zell-Marker CD 19, CD 20 oder CD 24 aus. Die Expression von CD 25 (Komponente des IL-2-Rezeptors, s. u.), CD 23 (Aktivierungsmarker), CD 11c (β_2 -Integrin) und der Adhäsionsmoleküle CD 54 und CD 58 ist variabel, das CD 5-Molekül befindet sich allerdings konstant auf allen B-CLL-Zellen (Rai und Patel, 1993, S. 1309).

1.2 Pathophysiologische Hintergründe

Als Ursache für die Akkumulation von langlebigen B-Lymphozyten im G_0 -Stadium des Zellzyklus wird vermutet, daß CLL-Zellen verschiedene Mechanismen ausgebildet haben, um Apoptose zu verhindern (Reed, 1998, S. 14). Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet (PCD). Morphologisch gekennzeichnet ist dieser

Vorgang durch Chromatinverdichtung, DNA-Spaltung, Verminderung des Zellvolumens und Fragmentation der Zelle in sogenannte „Apoptosekörperchen“. Letztere werden schließlich phagozytiert, ohne im Unterschied zur Zellnekrose eine Entzündungsreaktion hervorzurufen (Wang et al., 1997, S. 409, Löffler, 1998, S. 210). Verschiedene Signale, z. B. $\text{TNF}\alpha$, Aktivierung des Fas-Rezeptors (Apo1, CD 95), Glukokortikoide oder Mangel an Wachstumsfaktoren können Apoptose induzieren (Löffler, 1998, S. 210), wobei die unterschiedlichen Signalwege letztlich alle in der Aktivierung von Caspasen, proteolytischen Enzymen, die als inaktives Zymogen in jeder Zelle gespeichert sind, resultieren (Reed, 1998, S.16). Wachstumsfaktoren oder das Bcl-2-Gen-Produkt dagegen inhibieren Apoptose. Bei CLL findet sich eine Überexpression an Bcl-2-Gen-Produkt, vermutlich bedingt durch Hypomethylation des Genes, was eine gesteigerte Transkription zur Folge hat (Caligaris-Cappio et al., 1999, S. 403) oder weniger häufig durch Translokation, die das Bcl-2-Gen betrifft (Reed, 1998, S. 14). Dieser erhöhte Gehalt an Bcl-2-Protein ist meist auch assoziiert mit einer verminderten Expression von Fas-Ag (Robertson et al., 1995, S. 51), Bindung an den Fas-Rezeptor löst außerdem keine Apoptose aus (Laytragoon-Lewin et al., 1998, S. 270). In Kultur gehen B-CLL-Zellen jedoch rasch zugrunde (Collins et. al., 1989, S. 343), was darauf hinweist, daß exogene Signale für die verlängerte Lebenszeit in vivo von Bedeutung sind (Tretter et al., 1998, S. 41). In vitro kann Apoptose durch direkten Kontakt mit normalen Knochenmarksstromazellen (Lagneaux et al., 1998, S. 2387) oder aktivierten T_4 -Zellen (Tretter et al., 1998, S. 41) inhibiert werden.

Zytokine haben entscheidenden Einfluß auf B-CLL-Zellen. Verschiedene Faktoren verhindern Apoptose. IL-4 kann diesen Effekt über erhöhte Bcl-2-Protein-Expression (Panayiotis, 1993, S. 441) wie auch über eine erhöhte IL-4-Rezeptordichte (Douglas et al., 1997, S. 941) erzielen. Ebenso spielen $\text{IFN}\gamma$ (Buschle et al., 1993, S. 213), IL-8, IL-10 und IL-13 (Chaouchi, 1999, S. 1022) eine Rolle bei der Verhinderung von Apoptose (Meinhardt et al., 1999, S. 284).

Andere Faktoren fördern das Zellwachstum. Hier scheint $\text{TNF}\alpha$ besonders wichtig zu sein (Meinhardt et al., 1999, S. 283). Im Serum von CLL-Patienten läßt sich im Gegensatz zu Gesunden häufig $\text{TNF}\alpha$ nachweisen (Foa et al., 1990, S. 393), der als autokriner Wachstumsfaktor auf die Leukämiezellen wirkt (Cordingley et al., 1988, S.

969, Aderka et al., 1993, S. 2076). Aber auch bei normalen B-Zellen ist nach Stimulation über CD 40 bzw. durch IL-4 erhöhte Transkription des TNF α -Genes nachweisbar, es kommt ebenso durch autokrine Sekretion zur erhöhten Proliferation normaler B-Zellen (Boussiotis et al., 1994, S. 7007). Für IL-6 hingegen wurde nachgewiesen, daß es eine Einschränkung der durch TNF α hervorgerufenen Proliferation bewirkt (Aderka et al., 1993, S. 2076, Van Kooten et al., 1993, S. 618). Bei Patienten in fortgeschritteneren Krankheitsstadien wurden zudem niedrigere IL-6-Serumspiegel festgestellt als bei Patienten in Anfangsstadien, was auf Zusammenhänge zwischen niedriger IL6-Konzentration und Krankheitsprogression schließen läßt (Hulkkonen, 1998, S. 478). Die vom leukämischen Zellklon produzierten IL-8-Mengen führen auf autokrinem Weg zur Akkumulation von B-CLL-Zellen (Francia di Celle et al., 1996, S. 4382). Außerdem bewirken IL-7, IL-15 und IL-2 direkt sowie IL-10 indirekt über die Hochregulierung von hochaffinen IL-2-Rezeptoren Proliferation von CLL-Zellen (Meinhardt et al., 1999, S. 283, Fluckiger et al., 1993, S. 1473).

IL-2 stellt zusammen mit dem IL-2-Rezeptor einen wichtigen Mediator von B-Zell-Funktionen dar.

2. IL-2 und IL-2-Rezeptor

Normale wie maligne B-Zellen werden durch IL-2 zur Proliferation und zur IgM-Produktion angeregt (Mainou-Fowler et al., 1995, S. 482, Nelson et al., 1998, S. 14). Diese Effekte werden über den IL-2-Rezeptor vermittelt, der als Rezeptor-Komplex mit intermediärer Affinität ($K_d = 10^{-9}$) aus β - (p70 oder 75, CD 122) und γ_c -Untereinheit (CD 132) besteht (Takeshita et al., 1992, S. 2154), in den Komplex mit hoher Affinität ($K_d = 10^{-11}$) wird zusätzlich die α -Untereinheit (Tac, p55, CD 25) integriert (Waldmann, 1986, S. 727). Diese α -Untereinheit erhöht die Affinität für IL-2, ist aber für die intrazelluläre Signalübermittlung nicht von Bedeutung (Nelson et al., 1998, S. 20). Nach Ligandbindung kommt es zur Heterodimerisation der zytoplasmatischen Domänen der β - und γ_c -Untereinheit, woraufhin verschiedene Signalkaskaden ausgelöst werden, beispielsweise die Aktivierung der

Transkriptionsfaktoren STAT 3 und STAT 5 über Jak 1 und Jak 3 (Johnston et al., 1994, S. 151) oder der p38-MAP Kinase-Weg (Crawley et al., 1997, S. 15023) bzw. ein PIP-3-Kinase-abhängiger Weg beim Rezeptor mit intermediärer Affinität (Gonzalez-Garcia et al., 1997, S. 10220).

Der $\beta\gamma_c$ -Komplex fungiert auch als IL-15-Rezeptor mit intermediärer Affinität (Abbas et al., 1997, S. 266), die γ_c -Untereinheit ist ebenfalls Bestandteil der Rezeptoren für IL-4, IL-7 und IL-9 (Kondo et al., 1994, S. 1453, Nelson et al., 1998, S. 6).

Auf normalen ruhenden B-Zellen werden β - und γ_c -Kette in niedrigen Konzentrationen exprimiert, bei Aktivierung durch Bindung an den BCR (B-Zell-Rezeptor) kommt es zur vermehrten Expression (Nelson et al., 1998, S.8). Die α -Kette wird induziert nach Aktivierung durch BCR-Bindung (Bich-Thuy et al., 1985, S. 1075) durch SAC, IL-2 (Begley et al., 1990, S. 265) und nach CD 40-Stimulierung durch IL-10 (Fluckiger et al., 1993, S. 1473).

B-CLL-Lymphozyten exprimieren das CD-25-Antigen zu 50 Prozent und reagieren spontan auf IL-2 (Hivroz et al., 1986, S. 1001). IL-2 (Begley et al., 1990, S. 266) sowie IL-10 nach CD40-Aktivierung (Fluckiger et al., 1993, S. 1477) erhöhen die Anzahl an CD 25. IL-4 verhindert die IL-2-induzierte Proliferation von B-CLL-Zellen (Karray et al., 1988, S. 85).

Auch sogenannte CpG-Oligodesoxynukleotide führen zu vermehrter Expression von IL-2R α auf B-Lymphozyten (Liang et al., 1996, S. 1122).

3. CpG-DNA

Die immunstimulierende Wirkung von bakterieller DNA wurde anhand von DNA-Extraktionen aus *Mycobacterium bovis* (Bacille Calmette-Guèrin, BCG) durch Yamamoto und Tokunaga erkannt. Mykobakterielle DNA bewirkt Reduktion der Tumormasse bei Mäusen sowie IFN γ -Produktion und Steigerung der Zytotoxizität von NK-Zellen bei murinen Milzzellen und humanen PBMC (Tokunaga und Yamamoto, 1984, S. 955, Wagner, 1999, S. 331). Vertebraten-DNA dagegen ist inaktiv (Halpern et al., 1996, S. 72). Der Grund dafür liegt zum einen darin, daß in prokaryotischer DNA pro 16 Basen ein CpG-Dinukleotid enthalten ist, bei Vertebraten hingegen findet man

CpG-Suppression, d.h. CpG-Motive kommen weitaus seltener mit nur etwa 25 Prozent der Häufigkeit bei Prokaryoten vor (Krieg, 1996, S. 73), zum anderen sind bei Vertebraten die Cytosinbasen zu 80 Prozent methyliert, bei Bakterien jedoch findet man kein 5-Methylcytosin (Bird, 1993, S. 281, Krieg, 1996, S. 74).

Unterschiede im DNA-Aufbau		
	CG-Dinukleotide	Methylierung am Cytidin
Vertebraten-DNA	1 von 60 Dinukleotiden	Ja
bakterielle DNA	1 von 16 Dinukleotiden	Nein
CpG-Oligonukleotid	vorhanden, (CpG-Motive, z. B. 5'...GACGTT...3')	Nein

Tabelle 1: Übersicht zur unterschiedlichen Struktur von Vertebraten-DNA, bakterieller DNA und CpG-Oligonukleotiden

Krieg konnte durch Verwendung von synthetischen CpG-Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODN) zur Stimulierung von murinen B-Zellen nachweisen, daß ODN bestehend aus 12 bis 20 Basen, die ein CpG-Motiv, das von bestimmten Basen flankiert wird, nämlich 5'Pu-Pu-CpG-Py-Py-3', die höchste immunstimulatorische Aktivität aufweisen (Krieg et al., 1995, S. 546, Yamamoto T. et al., 1994, S. 119).

In vitro werden zur Stimulation v. a. sogenannte Phosphorothioat-Oligonukleotide verwendet, deren Phosphatgerüst durch Austausch eines nichtbrückenbildenden Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom resistent gegenüber Nukleasen gemacht wurde (Hartmann et al., 1999, S. 1618). Diese Verbindungen wurden initial zur Antisense-Therapie bei viralen Erkrankungen, v.a. HIV, eingesetzt (Branda et al., 1996, S. 330). Die chemische Modifikation dieser ODN ließ auf gegenüber Phosphodiester-ODN vermehrte Immunaktivierung schließen (Pisetsky, 1997, S.830), jedoch zeigte sich bei ebenfalls sulfurierten Kontrolloligonukleotiden, beispielsweise bei DSP 34 (5'-AAA AAA AG-3'), keine Proliferation (Liang et al., 1996, S. 1120).

Nach CpG-unabhängiger Aufnahme der ODN durch einen Oberflächenrezeptor, der zur Gruppe der Toll-like-Rezeptoren (TLR 9) gehört (Hemmi et al., 2000, S. 740),

werden diese endosomal im sauren Milieu modifiziert. Über den Stresskinase-Weg wird der Transkriptionsfaktor AP-1 (Activating Protein 1) phosphoryliert (Häcker et al., 1998, S. 102, Yi et al., 1998, S. 4494) bzw. über den NF- κ B-Weg der NF- κ B (Nuclear Faktor κ B) aktiviert (Häcker, 2000, S. 78, Hartman et al., 2000, S. 949), was in der Translokation beider Transkriptionsfaktoren in den Kern und vermehrter Transkription von Zytokingenen resultiert.

CpG-ODN haben auf verschiedene Zellpopulationen unterschiedliche Wirkung. Makrophagen sezernieren die Zytokine IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 und TNF α und exprimieren vermehrt die kostimulatorischen Moleküle CD 40, CD 80 und CD 86 und MHC-Moleküle der Klasse I und II (Martin-Orozco et al., 1999, S. 1111, Sparwasser et al., 1997, S. 1671, Lipford et al., 1998, S. 497), es kommt aber zu keinem Anstieg der mitotischen Aktivität (Bauer et al., 1999, S. 699). T-Zellen werden nicht direkt aktiviert (Bauer et al., 1999, S. 704), allerdings wird die Immunreaktion durch CpG-ODN in Richtung einer Th1-Antwort gelenkt (Wagner, 1999, S. 348, Lipford et al., 1998, S. 499). NK-Zellen reagieren mit Steigerung der zytotoxischen Aktivität und IFN γ -Sekretion (Bauer et al., 1999, S. 699).

CpG-ODN sind des weiteren polyklonale B-Zell-Aktivatoren (Liang et al., 1996, S. 1119). Murine B-Zellen treten nach Stimulierung mit ODN in den Zellzyklus ein (Yi et al., 1998, S. 5902), sezernieren IgM und die Interleukine 6 und 12 (Yi et al., 1996, S. 5401, Krieg et al., 1995, S. 546, Klinman et al., 1996, S. 2879). Zusätzlich wird Apoptose verhindert (Wang Z. et al., 1997, S. 162, Yi et al., 1998, S. 5898).

Bei humanen B-Zellen sind die Effekte ähnlich. Sie proliferieren (Decker et al., 2000, S. 999), produzieren IgM, IL-6 und IL-10 (Bauer et al., S. 699) und erhöhen die Dichte an Oberflächenmolekülen wie CD 40, CD 86, CD 25 und MHC I und II (Bauer et al., 1999, S. 703, Liang et al., 1996, S. 1122).

Auch bei B-CLL-Zellen verursachen ODN Zytokinsekretion (IL-6, TNF α), Zunahme der Dichte der Oberflächenmoleküle CD 40, CD 54, CD 58, CD 80, CD 86 und MHC I. Die Expression von CD 95 (Fas) bleibt unbeeinflusst (Decker et al., 2000, S. 999).

4. Bedeutung der Oberflächenmoleküle CD 40, CD 54, CD 58, CD 80, CD 86, MHC- Klasse I und MHC-Klasse II

Zur Aktivierung von T-Lymphozyten ist zusätzlich zur Bindung an den T-Zell-Rezeptor (TCR) noch ein zweites Signal in Form von kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC) oder Zytokinen nötig. Fehlt dieses zweite Signal, gehen über den TCR aktivierte T-Zellen entweder in Apoptose oder sie werden anerg (Van Parijs et al., 1997, S. 5336, Yuschenkoff et al., 1996, S. 1987). Als kostimulatorische Moleküle auf APCs, also auch auf B-Zellen, kommen hierbei CD 80 (B7-1), CD 86 (B7-2) (Hathcock et al., 1996, S. 132), CD 54 (ICAM-1) (Deeths et al., 1999, S. 45) und CD 58 (LFA-3) (Li et al., 1992, S. 71) in Frage.

Weiterhin interagieren B- und T- Zellen über das CD 40 - CD 40-Ligand-System (Clark et al., 1994, S. 425). Während T-Zellen das CD 40-L-Molekül (CD 154) nur nach Aktivierung exprimieren, tragen auch ruhende B-Zellen CD 40 (Van Kooten et al., 1996, S. 18, Stamenkovic et al., 1989, S. 1403). Bindung an CD 40 auf B-Lymphozyten, die zur Abwehr von Protein-Antigenen ebenso ein zweites Signal benötigen (Abbas et al., 1997, S. 196), führt durch CD 40 L auf aktivierten T-Helfer-Zellen zu B-Zell-Proliferation sowie Immunglobulin-Sekretion und verhindert Apoptose von B-Zellen im Keimzentrum (Clark et al., 1999, S. 425, Nishioka et al., 1994, S. 1032).

Im Gegenzug dazu können aktivierte B-Zellen, die B7-Moleküle (CD 80 und CD 86) exprimieren, T-Lymphozyten über Bindung an CD 28 zu Proliferation und Zytokinproduktion veranlassen (Clark et al., 1999, S. 42) oder durch Bindung an CTLA-4 die T-Zell-Aktivierung verhindern (Abbas et al., 1997, S. 155), wobei CD 86-Stimulation für eine Th2-Immunantwort nötig ist (Nakajima et al., 1997, S. 637).

Beide Vorgänge, sowohl die CD 40 – CD 40 L-Interaktion als auch die Bindung von B7 an CD 28, laufen wahrscheinlich in reziproker Reihenfolge ab. APCs induzieren auf T-Zellen die Expression von CD 40 L, über CD 40 erfolgt die Aktivierung von B-

Zellen, die wiederum durch erhöhte B7-Expression T-Zellen stimulieren (Hathcock et al., 1996, S. 154).

CD 54 (ICAM-1 = Intercellular adhesion molecule-1) kommt neben B-Zellen auf vielen stimulierten Zellen vor und erfüllt außer der Adhäsion von T-Lymphocyten und anderen Leukozyten über das Integrin CD 11a / 18 (LFA-1) (Larson et al., 1990, S. 181) auch eine Funktion als kostimulierendes Molekül, die für CD 8-Zellen ausgeprägter ist als für CD 4-Zellen (Deeths et al., 1999, S. 45).

CD 58 (LFA-3 = Leukocyte function associated antigen) bindet über das Adhäsionsmolekül CD 2 an T-Lymphocyten und hat ebenfalls kostimulatorische Effekte auf diese (Abbas et al., 1997, S. 159).

Auch bei CLL-Zellen findet man nach Stimulierung über CD 40 L Hochregulierung der Expression von B7-1 (Ranheim et al., 1993, S. 931, Yellin et al., 1994, S. 670) aber ebenso von CD 86, CD 54 und CD 58 (Van den Hove et al., 1997, S. 578), was mit erhöhter stimulatorischer Aktivität für T-Zellen einhergeht (Van den Hove et al., 1997, S. 575).

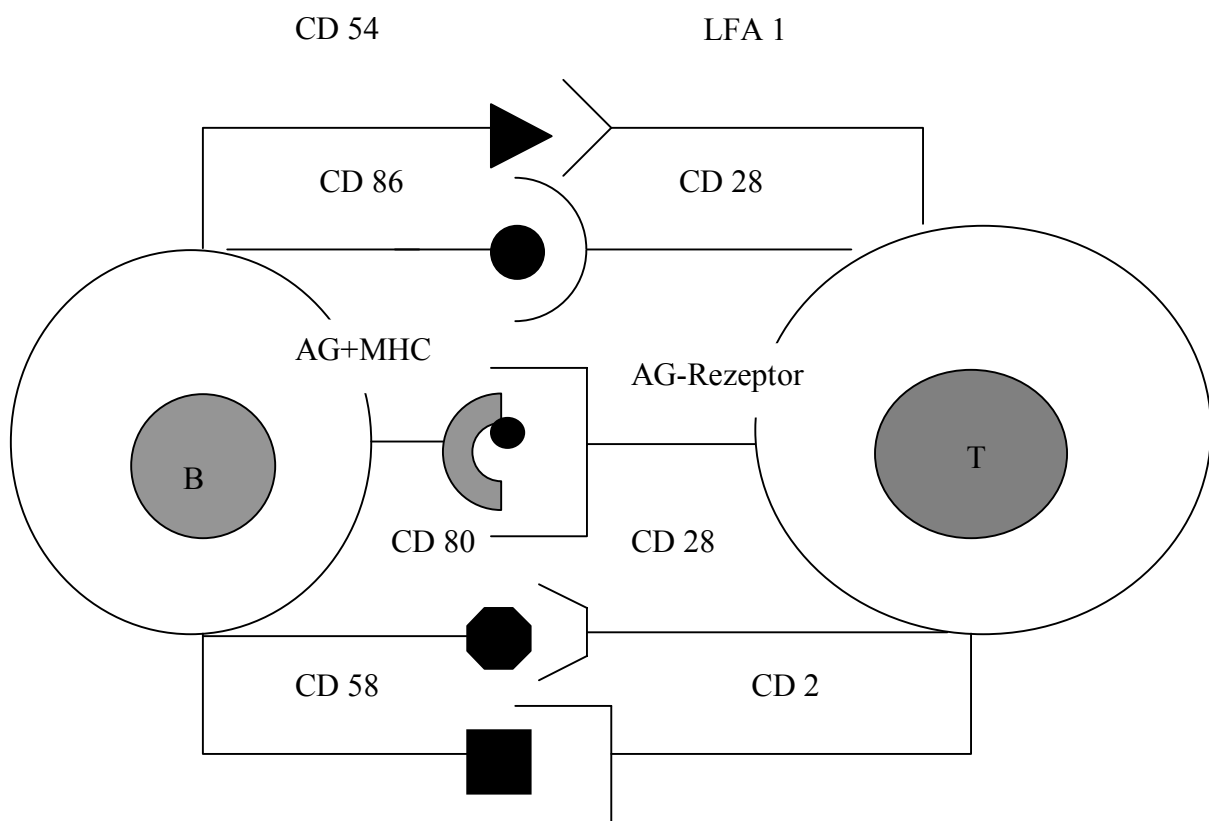


Abbildung 1: Oberflächenmoleküle, über die B- und T-Zellen interagieren, Erläuterung siehe Text

Ruhende CLL-Zellen sind einer Abwehr durch T-Zellen kaum zugänglich (Dazzi F. et al., 1995, S. 26). Bei mixed lymphocyte reactions (MLR) zeigt sich, daß B-CLL-Zellen ineffiziente Stimulatoren für T-Zellen sind (Ranheim et al., 1993, S. 925). Da B-CLL-Zellen MHC-Moleküle der Klasse I und II wie auch verändertes Oberflächen-Ig tragen (Todd et al., 1997, S. 235), liegt die Ursache dafür am ehesten an der niedrigen Anzahl an kostimulatorischen Molekülen (CD 80, CD 86), die als zweites Signal für die T-Zell-Aktivierung nötig sind (Mueller et al., 1989, S. 445, Dazzi et al., 1995, S. 29). Antigenpräsentierende B-Zellen, die keine B7-1-Moleküle tragen, können sogar Toleranz induzieren (Yuschenkoff et al., 1996, S. 1987).

Im Vergleich zu normalen B-Zellen ist die Funktion von B-CLL-Zellen als APC (antigenpräsentierende Zelle) eingeschränkt, da B-CLL-Zellen B7-1- und B7-2-Moleküle, die zur T-Zell-Aktivierung nötig sind, nur in geringer Anzahl auf ihrer Oberfläche tragen und CD 40-Interaktion mit CD 40-Ligand auf T-Zellen nötig ist, um diese Moleküle auf ausreichende Konzentrationen hochzuregulieren (Caligaris-Cappio, 1996, S. 2617, Dazzi et al., 1995, S. 26). Defekte in der Ig β -Kette (CD 79b) des B-Zell-Rezeptors (BCR) und niedrige Werte an assoziiertem sIg sind für die reduzierte Proliferation nach antigener Stimulation verantwortlich (Caligaris-Cappio et al., 1999, S. 401). Zusätzlich ist nach Bindung an den BCR häufig die Aktivität einer Proteintyrosinkinase (PTK), die für die Signaltransduktion nötig ist, vermindert (Lankester et al., 1995, S. 1092). CpG-ODN bieten die Möglichkeit, die Expression von CD 40 und kostimulatorischen Molekülen auf CLL-Zellen hochzuregulieren (Decker et al., 2000, S. 1003) unter Umgehung des BCR.

In dieser Arbeit wird der Einfluß einer Stimulation von B-CLL-Zellen mit CpG-ODN und bzw. oder IL-2 auf Proliferation, Zytokinproduktion und die Expression wichtiger Oberflächenmoleküle untersucht.

III Materialien

1. Laborgeräte

- Analysenwaage
Mettler 200 AE
- Auflichtmikroskope
Wilovert A (Hund)
V 200 (Hund)
- Autoklav
Melag 23
- Durchflußzytometer
EPICS XL-MCL (Coulter)
- Elektrophoresekammer
SUB-CELL GT (Biorad)
- ELISA-Reader
ELX 800 (Bio-Tek-
Instruments)
- Inkubator
BBD 6220 (Heraeus)
- Magnetic Particle Concentrator
MPC-1 (Dynal)
- Photometer
UV-Visible Spectro-
photometer (Pharmacia)
- PHD-Zellharvester
Dunn-Labortechnik
- Präzisionswaage
MC1 (Sartorius)
- Rotationsmischer
RM 5 (CAT)
- Stromquelle für Elektrophorese
LKB (Pharmacia)
- Szintillationszähler
(Beckmann)
- Thermocycler
Primus (MWG-Biotech)
- Thermomixer
5436 (Eppendorf)
- UV-Gerät
TIZ (Biometra)
- Vortex
Reax top (Heidolph)
- Waschgerät für ELISA
ETL
- Zentrifugen
Centrifuge 5415C
(Eppendorf)
Megafuge 3.ORS (Heraeus)
Rotana (Hettich)

2. Chemikalien

- Agarose zur DNA/RNA-Elektrophorese	Roth
- Ammoniumchlorid, NH ₄ Cl	Sigma
- Anti-Human-Ig	Boehringer Mannheim
- Anti-Human-IgM-Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Sigma
- Anti-Human-IL-6	Genzyme Diagnostics
- Anti-Human-IL-6, biotinyliert	Genzyme Diagnostics
- Anti-Human-TNF α	Genzyme Diagnostics
- Anti-Human-TNF α , biotinyliert	Genzyme Diagnostics
- Aqua ad injectabilia	Delta Pharma
- Asparagin (10 mg/ml)	Boehringer Mannheim
- Bromphenolblau	Fluka
- BSA, 30-prozentige Lösung	Sigma
- Chloroform	Sigma
- Desoxyribonukleotidmix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP jeweils 10 mM)	Boehringer Mannheim
- Detachabeads CD 4/CD 8 und CD 19	Dynal
- Diethanolamin	Sigma
- Diethylpyrocarbonat, DEPC	Sigma
- Dithiotreitol, DTT, 0.1 mM	Gibco
- DNA Ladder, 100 bp	Gibco
- Dynabeads M-450: CD 2 (Pan-T-Zell-Marker) CD 4 (T-Helfer-Zell-Marker) CD 8 (T-Suppressor-Zell-Marker) CD 14 (Monozyten-Makrophagen-Marker) CD 19 (Pan-B-Zell-Marker)	Dynal
- EDTA	Roth
- Ethanol, absolut	Merck
- Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Roth
- Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom

- Ficoll-Hypaque-Lösung, Dichte 1,077	Biochrom
- First Strand Buffer (5x)	Gibco
- Glutamin (200 mM)	Biochrom
- Heparin-Natrium 25 000 IE	Ratiopharm
- HEPES, 2-(4-(hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethanolsulfonsäure (1 M)	Gibco
- Human IL-6-Standard (10,24 ng/ml)	Genzyme Diagnostics
- IL-8-ELISA-Kit	Genzyme Diagnostics
- Karbonat-Bikarbonat-Puffer-Kapseln	Sigma
- Magnesiumchlorid, MgCl ₂	Sigma
- Meerrettichperoxidase-Streptavidin-Konjugat	Genzyme Diagnostics
- Merkaptoethanol	Sigma
- Natriumazid	Sigma
- Natriumhydroxid, NaOH	Fluka
- Natriumpyruvat (100 mM)	Gibco
- Nicht essentielle Aminosäuren (100 x)	Gibco
- Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer (0.5 µg/ml)	Gibco
- PCR-Reaktionspuffer mit MgCl (10x)	Boehringer Mannheim
- Penicillin (10 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	Gibco
- Phosphate Buffered Saline, PBS	Gibco
- p-Nitrophenyl-Phosphat-Tabletten, pNPP	Sigma
- Rekombinanter humaner TNF α -Standard (6ng/ml)	Genzyme Diagnostics
- RPMI 1640-Kulturmedium	Gibco
- Salzsäure, HCl, rauchend	Merck
- Schwefelsäure, H ₂ SO ₄ , 98 %	Fluka
- Sucrose	Sigma
- Superscript™ II, reverse Transkriptase (200 U/µl)	Gibco
- Taq-DNA-Polymerase (1 U/µl)	Boehringer Mannheim
- Thymidin, ³ H-markiert	DuPont
- TMB-Substratsystem, Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	Sigma
- TRI ^R -Reagenz	Molekular Research

	Center
- TRIS, Trishydroxymethylaminacetat	Serva
- Trypanblaulösung, 0.4 %	Gibco
- Tween 20, (Polyoxyethylensoritanmonolaurat)	Fluka

3. Lösungen

- Antikörper-Verdünnungs-Lösung:
 - 0.05 % Tween
 - 3 % BSA
 - in PBS
- Block-Lösung für IgM-ELISA:
 - 5 % BSA in PBS
- Block Puffer für TNF α - und IL6-ELISA:
 - 3 % BSA in PBS
- Bromphenolblaulösung:
 - 0.25 % Bromphenolblau
 - 40 % Sucrose
 - in Aqua dest.
- Coating-Lösung:
 - 1 Karbonat-Bikarbonat-Puffer-Kapsel
 - in 100 ml Aqua dest.
 - ergibt 0.05 M Pufferlösung, pH 9.6
- DEPC-Wasser:
 - 0.2 % Diethylpyrocarbonat in Aqua dest.
- Diethanolaminpuffer:
 - 48 ml Diethanolamin
 - 0.25 ml MgCl₂ (1 M)
 - 20 ml HCl (3 M)
 - ad 500 ml Aqua dest., pH 9.8

- Kulturmedium:
 - 500 ml RPMI 1640
 - 50 ml FCS (30 min bei 56 °C inaktiviert)
 - 5 ml Penicillin (10 IU/ml)-Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung
 - 5 ml HEPES (1 M), 1 ml Asparagin (10 mg/ml)
 - 5 ml Glutamin (200 µM), 3 ml Non-essential-amino-acids
 - 5 ml Merkaptoethanol
 - 5 ml Natriumpyruvat
- PCR-Puffer:
 - 100 mM TRIS-HCl
 - 15 mM MgCl₂
 - 500 mM KCl
 - pH 8,3
- pNPP-Substratlösung:
 - 5 mg pNPP-Substrattablette in
 - 5 ml Diethanolaminpuffer
- Stopp-Lösung für IgM-ELISA:
 - 2 N H₂SO₄
- Stopp-Lösung für IL6- und TNFα-ELISA:
 - 3 M NaOH
- TBE-Puffer (10x):
 - 108 g Tris
 - 55 g Borsäure
 - 40 ml EDTA, 0,5 M, pH 8,0
 - ad 1000 ml Aqua dest.
- Waschlösung:
 - 0.02 % Natriumazid
 - 0.05% Tween 20
 - in PBS
- Waschpuffer:
 - 0.05% Tween in PBS

4. Fluorochrommarkierte Antikörper

- Anti-CD 25-mAK, FITC-markiert	Immunotech
- Anti-CD 40-mAK, FITC-markiert	Pharmingen
- Anti-CD 54-mAK, FITC-markiert	Immunotech
- Anti-CD 58-mAK, PE-markiert	Immunotech
- Anti-CD 80-mAK, FITC-markiert	Immunotech
- Anti-CD 86-mAK, PE-markiert	Immunotech
- IgG ₁ -mAK, FITC-markiert	Pharmingen
- IgG ₁ -mAK, PE-markiert	Pharmingen
- Anti-HLA ABC-mAK, FITC-markiert	Immunotech

5. PCR-Primer

Hersteller: MWG-Biotech

Primer	Sequenz	T _m (°C)
New-β-Aktin sense	5'-ATG TTT GAG ACC TCC AAC AC-3'	53.0
New-β-Aktin antisense	5'-CAC GTC ACA CTT CAT GAT GGG-3'	57.0
New-IL-6 sense	5'-AAA TTC GGT ACA TCC TCG AC-3'	55.3
New-IL-6 antisense	5'-CAG GAA CTG GAT CAG GAC TT-3'	57.3
New-TNFα sense	5'-AAG CCT GTA GCC CAT GTT GT-3'	57.3
New-TNFα antisense	5'-CAG ATA GAT GGG CTC ATA CC-3'	57.3

6. Oligonukleotide und Zytokine

AP 1 (GCTTGATGACTCAGCCGGAA)	TibMolBiol
DSP 30 (TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTGCC)	TibMolBiol
p Z-2 (CTCCTAGTGGGGGTGTCCTAT)	TibMolBiol
Poly A (AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA)	TibMolBiol
PolyG (GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG)	TibMolBiol
IL 2	Peppo Tech

7. Plastikwaren

- Mikrotiterplatten für Zellkultur (24 -, 96-Loch)	Nunc
- Maxi Sorb C 96 Mikrotiterplatten für ELISA	Nunc
- Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner
- Pipettenspitzen	Eppendorf
- Polypropylenröhrchen (15, 50 ml)	Greiner
- Reaktionsgefäße (0.2, 0.5, 1.5 ml)	Eppendorf
- Sterilfilter (0,22 µm)	Milipore
- Zellkulturflaschen	Greiner

8. Untersuchungsmaterialien

Nach Einwilligung wurde peripheres Blut von Patienten, bei denen nach klinischen und immunophänotypischen Kriterien die Diagnose CLL gestellt worden war, abgenommen. Voraussetzung war, daß diese Patienten sich entweder keiner Behandlung unterzogen hatten oder für einen Zeitraum von mindestens drei Monaten nicht chemotherapiert worden waren. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen waren alle Patienten klinisch stabil, ohne Infektionen und unterzogen sich routinemäßigen ambulanten Kontrollen.

Für die Kontrollversuche wurden Blutproben von gesunden Freiwilligen verwendet. Die Anzahl der untersuchten Proben ist jeweils unter Ergebnissen aufgeführt.

IV Methoden

1. Zellbiologische Methoden

Zellbiologische Arbeiten wurden unter einem Laminarflow unter Verwendung steriler Geräte und Lösungen durchgeführt.

1.1 Zellseparationsmethoden

1.1.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC) durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte können die Zellen des peripheren Blutes mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt werden. Mononukleäre Zellen (Lympho- und Monozyten) bilden nach dem Zentrifugieren die Interphase zwischen verdünntem Serum darüber und Ficoll-Hypaque-Lösung darunter. Erythrozyten und Granulozyten finden sich als Sediment unterhalb der Ficoll-Schicht.

Material:

Ficoll-Hypaque-Lösung, Dichte 1.077 g/ml, 20 °C

Vollblut, heparinisiert mit 250 IE/ml

NH₄Cl-Lösung, 4°C

PBS

Durchführung:

In einem 50 ml-Röhrchen werden 25 ml Ficoll vorgelegt und vorsichtig mit einer 1:1-Mischung aus Blut und PBS überschichtet. Durch Zentrifugation für 25 min bei 1400 Upm ohne Bremse erfolgt die Auftrennung in Phasen. Die Interphase mit den PBMCs wird möglichst vollständig mit einer Pipette abgenommen, die Zellen dann bei 1600 Upm für 5 min sedimentiert. Das Pellet wird zweimal mit PBS gewaschen, um Rückstände von zelltoxischem Ficoll zu entfernen. Ist das Zellsediment rötlich gefärbt, was auf eine Verunreinigung mit Erythrozyten hinweist, sollte es zur Lyse der Erythrozyten in eiskalter Ammoniumchlorid-Lösung resuspendiert und nach 5 min wieder zweimal mit PBS gewaschen werden, um toxische Effekte auf die PBMCs zu

minimieren. Nachdem die Zellen in einer definierten Menge PBS aufgenommen wurden, kann die Anzahl bestimmt werden.

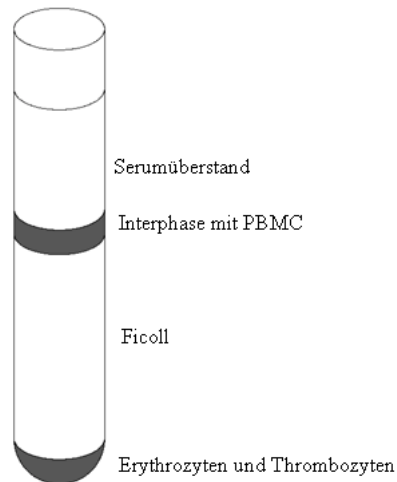


Abbildung 2: Phasen nach Dichtegradientenzentrifugation von Vollblut mit Ficoll

1.1.2 Zellzählung

Zur Zellzählung werden die PBMCs mit Trypanblaulösung verdünnt (meist 1:100). Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff, der nur tote Zellen anfärbt, lebende Zellen können aufgrund ihrer intakten Zellmembran den Farbstoff nicht aufnehmen. Ausgezählt werden vier Großquadrate der Neubauerkammer.

Die Zellzahl kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$Z = n * F * V$$

Z = Gesamtzellzahl

n = Zahl der lebenden Zellen in 4 Großquadraten

F = Verdünnungsfaktor

V = Volumen der Zellsuspension

1.1.3 Immunomagnetische Separation von B-Zellen aus PBMC

Um aus den durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnenen mononukleären Zellen bestimmte Zellpopulationen zu isolieren, benutzt man sogenannte DYNABEADS[®]. Dabei handelt es sich um magnetisierbare Polystyren-Partikel, an welche ein muriner monoklonaler Antikörper fixiert wurde, der gegen zellspezifische Oberflächenmoleküle gerichtet ist. Unter Verwendung eines Magneten können spezifisch gebundene Zellen aus Zellsuspensionen abgetrennt werden. Wird die gewünschte Zellart über Bindung und nachfolgendes Ablösen von Beads separiert, spricht man von Positivselektion, Negativselektion meint die Depletion unerwünschter Zellen.

1.1.3.1 Isolierung von B-CLL-Zellen

Bei CLL-Patienten findet man eine Umkehrung der T-Zell/B-Zell-Ratio, 90 % der Lymphozyten sind B-Zellen (Rai et al., S. 1309, 1993). Man kann davon ausgehen, daß isolierte PBMCs sich aus 80 % B-CLL-Zellen, 10 % Monozyten und 10 % T-Zellen zusammensetzen. Daher bietet sich an, eine Negativselektion durchzuführen, indem man Monozyten durch CD 14-Dynabeads und T-Zellen mit CD 2-Dynabeads entfernt.

Material:

Magnetic Particle Concentrator (MPC)
 Dynabeads M-450 Pan-T (CD 2), Dynal
 Dynabeads M-450 CD 14, Dynal
 PBS mit 2 % FCS

Durchführung:

Um ein unspezifisches Anheften von Phagozyten an Beads zu verhindern, ist darauf zu achten, Zellsuspensionen und Puffer während des gesamten Vorgangs auf ca. 4 °C zu halten.

Pro erwarteter Zielzelle werden 5 – 7 Beads benötigt, die vor Gebrauch mehrmals gewaschen werden müssen, um zur Konservierung beigesehtes zytotoxisches Natriumazid zu entfernen. Dazu werden die Beads zunächst resuspendiert, dann die

nach der Zielzellzahl berechnete Menge in ein 15 ml-Röhrchen überführt, mit PBS / FCS auf 8 ml aufgefüllt und in den MPC gestellt. Nach 2-3 min befinden sich die Beads am Magneten, so daß PBS / FCS mit einer Pipette am vorderen Rand des Röhrchens abgenommen werden kann. Diese Schritte werden noch zweimal wiederholt. CD 2- und CD 14-Beads werden am günstigsten im selben Röhrchen gewaschen.

Die PBMCs sollten nach dem Zählen auf eine Konzentration von $10 - 20 \times 10^6$ Zellen / ml in PBS / FCS eingestellt werden und können so zu den vorbereiteten Beads gegeben werden. Die Inkubation erfolgt für 45 min bei 4 °C auf einem Schüttelroller, um ein Sedimentieren der Beads zu verhindern. Dann wird die Suspension wieder auf 8 ml aufgefüllt und für 5 min in den Magnetständer gestellt, rosettierte T-Zellen und Monozyten sowie ungebundene Beads sammeln sich nun am Magneten, der Überstand sollte in ein neues Röhrchen umpipettiert und nochmals magnetisch aufgereinigt werden, um eventuell verbliebene T-Zell- bzw. Monozyten-Bead-Komplexe aus der B-Zell-Suspension zu entfernen. Abmagnetisierte Zellen werden verworfen, der Reinheitsgrad der isolierten B-Zellen wurde mittels FACS-Analyse überprüft.

1.1.3.2 Separation von B-Zellen bei Normalpersonen

Bei Normalpersonen bilden die B-Zellen nur einen Anteil von 10 – 15 % an den Gesamtlymphozyten (Abbas A. et al., 1997, S. 19), so daß man von den mononukleären Zellen maximal 20 % B-Zellen annehmen kann. Hier liegt es nahe, eine Positivselektion der B-Zellen mit CD 19-Beads durchzuführen, auch um optimale Reinheit der isolierten Zellen zu gewährleisten. Zum Abtrennen der B-Zellen von den Beads werden sogenannte Detachabeads verwendet. Diese bewirken als polyklonale Antikörper gegen Fab-Fragmente von Antikörpern ein kompetitives Lösen der Zell-Bead-Bindung.

Material:

Magnetic Particle Concentrator (MPC)

Dynabeads M-450 Pan-B (CD 19)

Detachabeads for use with CD 19-Dynabeads

PBS mit 2 % FCS, Kulturmedium

Durchführung:

Nach Waschen der errechneten Menge an Beads (je 5-7 Beads pro erwarteter Zielzelle) wie oben wird die auf $10 - 20 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellte PBMC-Zellsuspension zugegeben und wieder für 45 min bei 4 °C auf dem Schüttelroller inkubiert.

Anschließend wird das Röhrchen für 5 min in den MPC gestellt. Bei der hier durchgeführten Positivselektion werden die zum Magneten gewanderten Bead-B-Zell-Komplexe weiterverarbeitet, während der Überstand verworfen wird. Die rosettierten B-Zellen werden zur Aufreinigung noch dreimal in PBS/FCS resuspendiert und im MPC abgetrennt.

Dann werden sie in 100 µl Kulturmedium aufgenommen und mit 10 µl Detachabeads pro 10^6 erwarteten B-Zellen für 45 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttelroller inkubiert. Da hier mit sehr kleinen Volumina gearbeitet wird, sollte darauf geachtet werden, daß die Zellen sich am Boden des Röhrchens befinden.

Im MPC werden die abgelösten Beads entfernt (2-3 min), die B-Zellen befinden sich im Überstand. Um noch verbliebene B-Zellen zu entfernen, werden die Beads dreimal mit Kulturmedium gewaschen und der Überstand gesammelt. Auch die abgetrennten Zellen müssen dreimal (1600 U, 5 min) mit Medium gewaschen werden, um kontaminierende Detachabeads zu entfernen.

1.2 Kulturbedingungen

Die Kultivierung der isolierten B-Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Spannung von 5 %. Das verwendete RPMI-Kulturmedium enthält verschiedene Zusätze, u. a. Antibiotika und den Indikator Phenolrot, der bei Unterschreiten eines pH-Wertes von 7.4 durch Akkumulation von sauren Stoffwechselprodukten nach gelb umschlägt und so den Verbrauch des Mediums anzeigt.

Materialien:

Kulturmedium

24-Well-Platten, Nunc

96-Well-U-Bottom-Platten, Nunc

Stimulantien: IL-2, 10^3 U/ml, Pepro – Tech

Oligonukleotide, 20 μ M (DSP 30, AP 1, pZ 2 , Poly A,
Poly G), TibMolBiol

Abhängig davon, welche Nachweismethoden angeschlossen werden sollen, erfolgt eine Stimulation der B-Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen .

Zur Analyse von Oberflächenstrukturen der B-Zellen (FACS-Analyse), zur Bestimmung von Immunglobulinen und Zytokinen im Überstand sowie zur Durchführung einer RT-PCR werden die Zellen folgendermaßen kultiviert:

In 24-Well-Platten werden 100 μ l B-Zellen in einer Konzentration von 10^7 Zellen / ml vorgelegt, dann werden 100 μ l der Stimulantien in oben genannter Konzentration zugegeben und auf 1 ml mit Medium aufgefüllt. Dabei werden eine Mediumkontrolle ohne Zusatz aktivierender Substanzen sowie verschiedene Stimulationen, beispielsweise mit IL-2 und DSP 30 angesetzt.

Für die FACS-Analyse und die Bestimmung der Zytokine aus den Überständen müssen die Ansätze 48 Stunden inkubieren. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert, die Überstände können bei -20°C aufbewahrt werden.

Zur Quantifizierung der IgM-Bildung wird der Überstand erst nach neuntägiger Inkubation entnommen.

Die Zellen zur RNA-Extraktion mit anschließender RT-PCR werden nach 24 und 48 Stunden entnommen. Für jede Stimulation werden 2×10^6 Zellen benötigt.

Um einen Proliferationsassay durchzuführen, werden B-Zellen wie oben stimuliert, allerdings erfolgt der Ansatz in 96-Well-U-Bottom-Platten. Es werden je 20 μ l einer Zellsuspension der Konzentration 5×10^5 Zellen / ml eingesetzt, 20 μ l Stimulantien in der obigen Konzentration zugegeben und auf 200 μ l mit Medium ergänzt. Inkubiert wird zunächst für 72 Stunden.

1.3 Proliferationsassay

Die Proliferation von B-Zellen kann in vitro anhand des Einbaus von ^3H -markiertem Thymidin in sich replizierende DNA von kultivierten Zellen gemessen werden. Durch Thymidininkorporation ist also die quantitative Bestimmung der DNA-Synthese, die direkt proportional zur Zellteilungsrate ist, möglich.

Material:

^3H -markiertes Thymidin, DuPont

Kulturmedium

PHD-Zellharvester, Dunn-Labortechnik

β -Szintillationszähler, Beckmann

Filterpapier, Schleicher und Schüll

Durchführung:

B-Zellen werden nach den aufgeführten Bedingungen für 72 Stunden inkubiert. Nach Zugabe von $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Thymidin in $20 \mu\text{l}$ Kulturmedium pro Vertiefung erfolgt die Aufnahme des Nukleotids während nochmaliger Inkubation für 16 Stunden. Die Zellen können dann entweder sofort geerntet oder bei -20°C aufbewahrt werden.

Anschließend werden die Zellen durch einen Harvester auf Filterpapier transferiert, nach Trocknen wird mittels eines Szintillationszählers die inkorporierte Aktivität bestimmt und die Zerfälle werden in cpm (counts per minute) angegeben.

Jede Bestimmung wird im Dreifachansatz durchgeführt.

1.4 Analyse von Oberflächenstrukturen mittels Durchflußzytometrie

Oberflächenmoleküle von Zellen können über Durchflußzytometrie unter Verwendung von sogenannten FACS-Geräten (Fluorescence Activated Cell Sorter) analysiert werden. Dazu werden stimulierte B-Zellen mit fluorochromkonjugierten Antikörpern, die gegen das zu bestimmende CD-Molekül gerichtet sind, inkubiert. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienen FITC (Fluoresceinisothiocyanat) und PE (Phycoerythrin). Diese emittieren bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm durch einen Argonlaser im FACS-Gerät Fluoreszenzspektren mit einem Maximum bei 525 nm (FITC) bzw. 575 nm (PE), was gemessen wird.

Als Negativkontrollen werden B-Zellen mitgeführt, die mit fluorochrommarkierten Maus-IgG₁-Antikörpern inkubiert wurden, also mit Antikörpern des gleichen Isotyps wie sie für die Bestimmung benutzt wurden. Dadurch können unspezifische Bindungen erkannt werden.

Material:

Fluorochrommarkierte monoklonale Antikörper gegen CD 25, CD 40, CD 54, CD 58, CD 80, CD 86, MHC I, MHC II (Pharmingen bzw. Immunotech)

Isotyp-Kontrollen, Maus IgG₁, FITC- bzw. PE-markiert (Pharmingen)

FACS-Puffer (PBS mit 1% BSA)

Durchführung:

10⁶ B-Zellen werden nach Stimulation (s. o.) und Zentrifugation in FACS-Puffer resuspendiert. Je 100 µl der Zellsuspension werden mit 10 µl eines fluorochrommarkierten Antikörpers für 20 min bei 4°C inkubiert und nach Zugabe von 0.5 ml FACS-Puffer bei 1600 U für 5 min gewaschen. Der Überstand wird verworfen, die Zellen erneut in 0.5 ml FACS-Puffer aufgenommen. Nun kann die Analyse im Durchflußzytometer erfolgen. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der WinMDI 2.8 FACS-Software, nachdem jeweils 5000 Zellen analysiert wurden.

2. ELISAs zur Bestimmung von IL-6, TNFα, IL-8 und Ig M

Die Zytokine IL-6 und TNFα sowie Immunglobulin M (Ig M) wurden mittels ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assay) nach dem Sandwich-Prinzip bestimmt. Dabei wird ein Antikörper, der für das zu bestimmende Protein (Antigen) spezifisch ist, an eine feste Phase adsorbiert. Bei Zugabe der Probe bindet sich darin enthaltenes Antigen an den Antikörper. Im nächsten Schritt wird ein Sekundärantikörper zugegeben, der ebenfalls für das zu messende Antigen spezifisch ist, jedoch gegen eine andere antigene Determinante gerichtet sein muß als der erste Antikörper, da eine Bindung sonst nicht möglich wäre. Dieser Sekundärantikörper ist mit einem Enzym konjugiert, das ein Substrat, meist Chromogene, umsetzt und so eine photometrische Quantifizierung der Antigenmenge in der Probe erlaubt. Entscheidend ist es hierbei,

zwischen den einzelnen Schritten ungebundenes Antigen bzw. Antikörper-Enzym-Konjugat durch Waschen zu entfernen. Die Auswertung erfolgt über eine Standardkurve, die durch Analyse von Lösungen mit bekannter Konzentration erstellt wird.

Die Bestimmungen erfolgen aus Zellkulturüberständen. Für die IL-6- und TNF α -Messung werden die B-Zellen 48 Stunden stimuliert, um IgM zu quantifizieren, ist eine Inkubation von 9 Tagen notwendig.

2.1 IL- 6- und TNF α -ELISA

Für die Bestimmung von IL-6 und TNF α wurden Testkits der Firma Genzyme Diagnostics verwendet, die sich nur in wenigen Details unterscheiden. Der Sekundärantikörper ist bei beiden biotinyliert. Die Koppelung an eine Enzymreaktion erfolgt durch ein Meerrettichperoxidase-Streptavidin-Konjugat. Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation des Substrates TMB. Streptavidin, ein biotinbindendes Protein, das aus *Streptomyces avidinii* isoliert wird, stellt die Verbindung zum Sekundärantikörper her.

Materialien:

Maxi-Sorp C 96-Mikrotiterplatten (Nunc)

Testkit der Firma Genzyme Diagnostics mit:

- Human IL-6- bzw. TNF α -Capture Antibody, Primärantikörper
- Human IL-6- bzw. TNF α -Second Antibody, biotinyliert
- Human IL-6-Standard (10.24 ng/ml), verdünnt auf Konzentrationen von 512 bis 8 pg/ml mit Kulturmedium
- Human TNF α -Standard (6 ng/ml), verdünnt auf Konzentrationen von 1000 bis 15.6 pg/ml
- Meerrettichperoxidase-Streptavidin-Konjugat

Coating-Lösung, 1 Bikarbonat-Puffer-Kapsel (Sigma) in 100 ml Aqua dest.

Block-Puffer, PBS mit 3% BSA

Wasch-Puffer, PBS mit 0.05 % Tween 20

Antikörperverdünnungslösung, PBS mit 3 % BSA und 0.05 % Tween

TMB-Substratsystem, Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid

Stopp-Lösung, 2 N H₂SO₄

Durchführung:

- Die Platte wird über Nacht mit je 100 µl Primärantikörper (auf 6 µg/ml bei IL-6, auf 2 µg/ml bei TNFα mit Coating-Lösung verdünnt) beschichtet bei Raumtemperatur (IL-6) bzw. 4 °C (TNFα).
- Um Verluste von Flüssigkeit zu verhindern, wird empfohlen, bei allen Inkubationsschritten die Platten mit Folie abzudecken.
- Die Primärantikörperverdünnung wird abgesaugt und die Vertiefungen fünfmal mit Waschpuffer durch einen Automaten gewaschen.
- Nach Zugabe von je 250 µl Block-Puffer wird die Platte für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.
- Nachdem der Block-Puffer dekantiert wurde, werden beim IL6-ELISA zunächst 75 µl Kulturmedium pro Vertiefung vorgelegt, dann 25 µl der Standardverdünnungen bzw. der Proben zupipettiert und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Beim TNFα-ELISA werden je 100 µl der Standardverdünnungen und Proben zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Es werden jeweils Doppelbestimmungen angesetzt.
- Ungebundene Zytokine werden durch fünfmaliges Waschen entfernt. Dann kann der verdünnte Sekundärantikörper (auf 0.025 µg/ml bei IL-6, auf 0.5 µg/ml bei TNFα mit Antikörperverdünnungslösung) mit 100 µl pro Vertiefung zugegeben werden. Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 1 Stunde.
- Nach erneutem fünfmaligen Waschen werden je 100 µl des Meerrettichperoxidase-Streptavidin-Konjugates (1: 4000 mit Antikörperverdünnungslösung) zugegeben und bei 37°C für 20 min inkubiert.
- Wiederum wird fünfmal gewaschen, danach werden 100 µl des TMB-Substratsystems zugegeben. Innerhalb von 20 min kann die blaue Farbentwicklung bei Raumtemperatur beobachtet werden.

- Durch Zugabe von 100 µl 2 N H₂SO₄ wird die Reaktion zu gegebener Zeit abgestoppt, der Farbstoff erscheint nun gelb.
- Bei einer Wellenlänge von 450 nm wird die Extinktion im ELISA-Reader gemessen.
- Ein Auswertprogramm ermittelt durch Vergleich mit der Standardkurve die Zytokinkonzentrationen.

2.2 IL-8- ELISA

Die IL-8-Konzentration im Überstand der Zellkulturen wurde mittels eines käuflich erworbenen Testkits der Firma Genzyme Diagnostics bestimmt.

2.3 Ig M-ELISA

Ig M wurde mit einem selbst zusammengestellten ELISA bestimmt. Der Sekundärantikörper ist direkt an das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt. Diese setzt das Chromogen pNPP um, was zu einer Gelbfärbung führt.

Material:

Maxi-Sorb C 96-Platten (Nunc)

Waschlösung, 0.02 % Na-Acid, 0.05 % Tween in PBS

Block-Lösung, PBS mit 5 % BSA

Diethanolaminpuffer: - 48 ml Diethanolamin
 - 0.25 ml MgCl₂, 1M
 - ad 500 ml Aqua dest.
 - mit 3 M HCl auf pH 9.8 eingestellt

pNPP-Substrat-Lösung, 5 mg-Tablette in 5 ml Diethanolaminpuffer

Stopp-Lösung, 3M NaOH

Coating-Lösung, Anti-Human-Ig (Boehringer Mannheim), 1: 500 in PBS verdünnt

Alkalische-Phosphatase-konjugierter Sekundär-Antikörper (Sigma), 1:700 verdünnt in PBS / 3% BSA

Human Ig M-Standard, 1 mg/ml, auf Konzentrationen von 500 bis 15.6 ng/ml verdünnt

Durchführung:

- Falls nicht anders angegeben, werden 75 µl pro Vertiefung einpipettiert.
- Die Platte wird über Nacht bei 4 °C mit Coating-Lösung (s.o.) beschichtet.
- Nach viermaligem Waschen werden je 200 µl Block-Lösung zugegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
- Nach 4 Waschvorgängen werden pro Vertiefung 50 µl Block-Lösung vorgelegt und Standards und Proben einpipettiert. Beide Schichten werden durch kurzes Schütteln vermischt. Inkubiert wird 2 Stunden bei 37 °C.
- Es folgen erneut 4 Waschgänge, der verdünnte alkalische-Phosphatase-konjugierte Sekundärantikörper wird zugegeben und für 45 min bei 37 °C inkubiert.
- Nach nochmaligem Waschen (4 x) wird die pNPP-Substratlösung zugegeben und die Reaktion nach 10 – 40 min durch je 50 µl 3M NaOH gestoppt.
- Die optische Dichte wird bei 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm im ELISA-Reader ermittelt.
- Durch eine Standardkurve können die Ig M-Konzentrationen bestimmt werden.

3. Molekularbiologische Methoden**3.1 RNA-Isolierung mit TRI^R-Reagenz**

Bei der RNA-Isolierung mit TRI^R-Reagenz handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Single-Step-Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987).

Dieses Reagenz ermöglicht sowohl die Extraktion von DNA und Proteinen als auch von RNA, wovon letzteres für diese Arbeit relevant ist. Isoliert wird die gesamte Zell-RNA (tRNA, mRNA, rRNA), allerdings ist für den Nachweis von Zytokinproduktion schon auf Transskriptionsebene anhand einer RT-PCR nur mRNA von Bedeutung.

RNA ist hochempfindlich gegenüber abbauenden Enzymen (RNasen). Um eine Kontamination mit exogenen RNasen möglichst zu vermeiden, ist eine Reihe von Vorsichtsmaßnahmen nötig:

Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen müssen vor Gebrauch autoklaviert werden. Behandlung von Wasser mit DEPC gewährleistet eine weitgehende Elimination von RNasen. Da Hände und Staub als die wichtigsten Quellen von Verunreinigungen mit RNasen anzusehen sind, ist darauf zu achten, Handschuhe zu tragen sowie die Röhren stets geschlossen zu halten.

TRI^R-Reagenz besteht nur aus einer Phase, in der Phenol und Guanidiniumisothiocyanat enthalten sind. Dies ermöglicht eine effektive Inhibition auch von endogenen RNasen. Guanidiniumisothiocyanat denaturiert Proteine, Phenol als guter Wasserstoffbrückenbildner, der gleichzeitig hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäureresten eingehen kann, bewirkt eine Dissoziation von Protein-Nucleinsäure-Komplexen.

Material:

TRI^R-Reagenz

Chloroform

Isopropanol, 100 %

Ethanol, 75 %

DEPC-Wasser, 0.2 %

Durchführung:

Die Isolierung der RNA erfolgt in fünf Schritten:

1. Homogenisierung:

Nachdem die stimulierten B-Zellen aus der Kulturschale entnommen und in einem 50ml Röhren bei 1500 U fünf Minuten sedimentiert wurden, wird der Überstand abgesaugt und die Zellen in 1 ml TRI^R-Reagenz pro 10×10^6 Zellen durch wiederholtes Pipettieren homogenisiert. Das Homogenat wird in ein 1,5 ml-Röhren überführt und kann bei -80°C aufbewahrt oder sofort weiterverarbeitet werden.

2. Phasen-Separation:

Um eine vollständige Dissoziation der Protein-Nucleinsäure-Komplexe zu ermöglichen, wird das Homogenat 5 min bei Raumtemperatur belassen. Nach Zugabe von Chloroform werden die Proben durch kräftiges Schütteln für 5 min gemischt, anschließend für 2 – 15 min bei Raumtemperatur stehen lassen und auf 12 000 g für 15

min bei 4°C zentrifugiert, wonach sich eine Aufteilung in eine untere rötlich gefärbte Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere wässrige Phase zeigt. Die RNA verbleibt ausschließlich in der wässrigen Phase, während sich DNA und Proteine in der Interphase und der organischen Phase befinden.

3. RNA-Fällung:

Die wässrige Phase wird in ein neues Röhrchen überführt und durch Mischen mit 0.5 ml Isopropanol pro 1 ml anfangs eingesetztem TRI^R-Reagenz wird die RNA präzipitiert. Nach fünf Minuten bei Raumtemperatur werden die Proben auf 12 000 g für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Das RNA-Präzipitat bildet ein weißes Pellet am Boden oder an der Wand des Röhrchens.

4. Waschen der RNA:

Nach Absaugen des Überstandes erfolgt das Waschen der RNA in Ethanol (75 %). Hierfür wird pro 1 ml ursprünglich verwendetem TRI^R-Reagenz 1 ml Ethanol eingesetzt. Die vorher gevortexten Proben werden auf 7500 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert.

5. Auflösen der RNA:

Der Ethanol-Überstand wird entfernt, das Pellet für 3 – 5 min luftgetrocknet. Dabei ist darauf zu achten, daß kein vollständiges Eintrocknen erfolgt, weil sonst die Löslichkeit der RNA wesentlich eingeschränkt ist. Das Pellet wird in 20 µl DEPC-Wasser durch wiederholtes Pipettieren und zehnmütiges Inkubieren bei 55 °C aufgelöst.

3.2 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung der isolierten RNA

Die RNA-Konzentration der Proben kann photometrisch bestimmt werden. Dazu wird die Extinktion der 1:100 mit DEPC-Wasser verdünnten Proben bei 260 nm und bei 280 nm mittels eines Zweistrahlphotometers mit einer Quecksilberniederdrucklampe als Lichtquelle gemessen. Das Extinktionsmaximum von RNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Diese unterschiedlichen spektralen Eigenschaften nutzt man für eine Reinheitsbestimmung des RNA-Extrakts. Ein Quotient der OD (Optische Dichte) 260 nm / 280 nm zwischen 1.6 und 1.9

bedeutet Reinheit der RNA-Präparation. Ist er höher, ist dies ein Hinweis auf eine Verunreinigung mit Phenol, ist er niedriger, liegt eine Verunreinigung mit Proteinen vor.

Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgt anhand des Lambert-Beerschen-Gesetzes, nach dem die Extinktion einer Lösung proportional zur Konzentration und Schichtdicke der Küvette ist.

$$E = \epsilon * c * d$$

E = Extinktion (dimensionslos)

ϵ = spezifischer Extinktionskoeffizient (ml / g * cm)

c = Konzentration der Lösung (g / 100 ml)

d = Schichtdicke (cm)

Die Konzentration kann folgendermaßen berechnet werden:

$$C (\mu\text{g} / \text{ml}) = \frac{E (260 \text{ nm}) * 50 \mu\text{g} / \text{ml} * \text{cm}}{d (\text{cm})} * 100$$

3.3 Reverse Transkription von Gesamt-RNA

Bei reversen Transkriptasen handelt es sich um der Familie der Retroviren eigene RNA-abhängige-DNA-Polymerasen. Diese Enzyme können gentechnisch hergestellt werden, beispielsweise durch Einschleußen des pol-Gens des Moloney Murine Leukemia Virus in E. coli wie bei der hier verwendeten reversen Transkriptase Superscript™ II (Gibco), und ermöglichen so die Synthese von cDNA aus der isolierten RNA in vitro. Als Primer dienen Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Nukleotide, die aus 12 – 18 Desoxythymidinbausteinen bestehen. Sie hybridisieren mit Polyadenylatresten, die sich bei jeder mRNA am 3'-Ende befinden, so daß die gesamte mRNA in voller in Länge in cDNA umgeschrieben wird.

DTT reduziert Disulfide zu den entsprechenden Thiolen und wird zur Enzymstabilisierung sowie Proteindenaturierung zugegeben.

Durchführung:

Auch hier ist es wichtig, die oben genannten Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung einer Kontamination mit RNasen einzuhalten. Pro Probe werden 3 µg RNA vorgelegt und mit Aqua dest. auf 16 µl aufgefüllt. Dazu werden 16 µl des vorbereiteten Mastermixes pipettiert.

Ansatz des Mastermixes:

Oligo-d(T) ₁₂₋₁₈ -Primer, 0.5 µg/µl (Gibco)	2 µl
Nucleotid-Mix, je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Boehringer)	2 µl
DTT, 0,1M (Gibco)	4 µl
First Strand Buffer, 5x (Gibco)	8 µl

Der Reaktionsansatz wird nun, um die RNA zu denaturieren, 5 min auf 65°C erwärmt. Durch Zugabe von 1 µl Superscript™ II (200 U/µl) wird die reverse Transkription gestartet. Nach Inkubation für 1 Stunde bei 37°C wird bei 95 °C für 5 min das Enzym denaturiert und so die Reaktion abgestoppt. Die synthetisierte cDNA kann bei – 20°C aufbewahrt oder sofort für die PCR eingesetzt werden.

3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) mit cDNA

Bei der 1984 von Kary Mullis entwickelten PCR handelt es sich um eine Methode zur in-vitro-Amplifizierung von spezifischen DNA-Fragmenten (Löffler G., 1998, S. 231) von einigen hundert bis einigen tausend Basenpaaren Länge. Die Reaktion besteht aus wiederholten Zyklen, die sich wiederum aus drei Phasen zusammensetzen :

1. Denaturierung der DNA:

Bei 95°C lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleotidbausteinen des Doppelstranges, so daß die DNA nun in Form der beiden komplementären Einzelstränge vorliegt.

2. Anlagerung der Primer:

Hierfür ist es nötig, die Basensequenz der beiden Enden des zu kopierenden DNA-Stückes zu kennen, um jeweils dazu komplementäre Primer einsetzen zu können. Diese Primer, bestehend aus 15 – 25 Basen, hybridisieren mit den 3'-Enden der beiden DNA-Stränge.

Das Temperaturoptimum für die Primeranlagerung ergibt sich aus der spezifischen Schmelztemperatur (T_m) der verschiedenen Primer, die im wesentlichen vom GC-Gehalt abhängig ist, und bei Oligonukleotidsequenzen aus 20 Basen wie folgt berechnet werden kann:

$$T = [(GC\text{-Gehalt}) * 4 + (AT\text{-Gehalt}) * 2] - 5$$

Es liegt bei den für diese Arbeit verwendeten Primern bei ca. 57 °C. Beide Primer sollen im Überschuß zugegeben werden.

3. DNA-Synthese:

Durch Anlagerung der im Ansatz enthaltenen Nucleotide synthetisieren DNA-Polymerasen von den Primern ausgehend neue DNA-Stränge, die den Einzelsträngen, die ihnen als Matrize dienen, komplementär sind. Für die PCR wird die besonders thermostabile Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* benutzt. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 72 °C, die Enzymaktivität bleibt jedoch auch nach wiederholtem Erhitzen auf 95 °C erhalten. Das bietet den entscheidenden Vorteil, daß das Enzym nicht nach jeder Denaturierungsphase erneut zugegeben werden muß.

Durch Verwenden von sogenannten Thermocyclern, die die Temperatur ihrer Blöcke innerhalb weniger Sekunden variieren können, ist das Durchführen zahlreicher Zyklen in einigen Stunden möglich. In der Regel werden 20 - 40 Zyklen durchlaufen, wobei es theoretisch bei jedem Zyklus zu einer Verdoppelung der DNA-Menge kommt, nach 30 Zyklen lägen $x * 2^{30}$ identische Kopien der Ausgangs-DNA (x) vor.

Material:

cDNA

Taq-DNA-Polymerase, 1×10^3 U/ml , Boehringer MannheimSense-Primer, 10 μ M, MWG-BiotechAntisense-Primer, 10 μ M, MWG-BiotechPCR-Reaktionspuffer mit MgCl₂ (10x), Boehringer Mannheim

PCR-Nukleotid-Mix, dATP, dCTP, dGTP, dTTP jeweils 10 mM, Boehringer Mannheim

Aqua dest.

Durchführung :

Zunächst wird ein Mastermix mit folgendem Inhalt pro Probe pipettiert:

Desoxynukleotide	0.5 μ l
Sense Primer	2.5 μ l
Antisense Primer	2.5 μ l
PCR-Reaktionspuffer (10 x)	2.5 μ l
Aqua dest.	8.0 μ l

Dann werden je 16 μ l des Mastermixes auf 0.2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und 4 μ l von den cDNA-Proben zugegeben. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 μ l Taq-Polymerase gestartet. Im Thermocycler durchlaufen die Proben nachfolgendes Programm:

Denaturierung	95 °C	5 min
35 Zyklen à	1.	94 °C
	2.	57.3 °C
	3.	72 °C
Primer Extension	72 °C	8 min

Die Sequenzen der Primer sind auf Seite 23 aufgeführt.

Größe der PCR-Amplifikate:

PCR-Produkt	Größe
IL-6	295 bp
TNF α	330 bp
β -Aktin	489 bp

Das ubiquitäre β -Aktin-Gen läßt eine Aussage über das Gelingen der cDNA-Synthese zu und wird deshalb als Kontrolle mitamplifiziert.

3.5 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Durch die DNA-Gelelektrophorese kann die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente mit Hilfe mitgeführter DNA-Längenstandards (Marker oder DNA-Leiter) abgeschätzt werden. Unter elektrophoretischen Bedingungen sind die Phosphatgruppen im Rückgrat von Nukleinsäuren dissoziiert, weshalb sie als Polyanionen im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Größe der DNA-Moleküle.

Die Auftrennung wird in horizontalen Flachbett-Agarose-Gelen (1.5%) durchgeführt. Zum Markieren der Lauffront werden die Proben mit Bromphenolblaulösung versetzt. Da das Gel Ethidiumbromid, einen Fluoreszenzfarbstoff, der zwischen die Basen interkaliert, enthält, können DNA-Banden mittels UV-Licht detektiert werden. Zur Dokumentation werden sie dann mit einer speziellen Kamera mit vorgeschaltetem Rotfilter fotografiert.

Material:

DNA-Probe	jeweils 9 μ l
Bromphenolblaulösung	je 3 μ l pro Probe
Ethidiumbromid (Roth)	10 bzw. 1.5 μ l , Endkonzentration 0.5 μ g/ml
TBE-Puffer (1x)	200 ml , bzw. 30 ml
100 bp-DNA-Leiter (Gibco)	25 ng/ml
Agarose (Roth)	3 g bzw. 0.45 g, 1.5 %

Durchführung:

1.5 % Agarose wird in TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 70 °C wird Ethidiumbromid zugefügt und in den Agarosegelträger gegossen. Durch Einsetzen eines Kammes werden Probetaschen vorgefertigt. Das erstarrte Gel wird in die Elektrophoresekammer eingelegt und mit TBE-Puffer überschichtet. Die Taschen werden mit den Proben, die mit Bromphenolblaulösung versetzt sind, sowie dem DNA-Längenstandard angefüllt. Bei einer angelegten Spannung von 80 mV werden die DNA-Proben für ca. eine Stunde aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht fotografiert.

4. Statistische Auswertung

Die meisten Experimente wurden in Mehrfachbestimmung durchgeführt und das Ergebnis als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben.

SEM und Standardabweichung (SA) wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$$SA = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$SEM = \frac{SA}{\sqrt{n}}$$

x_i : einzelne Messwerte

\bar{x} : Mittelwert

n : Anzahl der Meßwerte

Mit einem zweiseitigen t-Test für verbundene Stichproben (Sachs 1984) wurde geprüft, ob die Mittelwerte einer Meßreihe sich von den Mittelwerten der entsprechenden Kontrollmeßreihe signifikant unterscheiden. Bei gepaarten Proben wurde der Mann-Whitney-Test eingesetzt. Es wird die Irrtumswahrscheinlichkeit p angegeben, mit der die Mittelwerte sich unterscheiden. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von mehr als fünf Prozent (0.05) werden die Mittelwerte als nicht signifikant verschieden bezeichnet.

V Ergebnisse

1. Reinheit der isolierten Zellpopulationen

Nach dem Separationsvorgang wurde die Reinheit der isolierten B-Zell-Population mittels Durchflußzytometrie bestimmt, um eine Kontamination durch andere Zellpopulationen wie z. B. Monozyten oder T-Zellen auszuschließen, die die Ergebnisse durch Proliferation, Zytokinproduktion, Expression von Oberflächenmolekülen und RNA-Synthese verfälschen könnten.

Für maligne B-Zellen konnte ein Reinheitsgrad von über 98 Prozent mittels FACS-Analyse ermittelt werden, wobei nichtmaligne B-Zellen nur einen unbedeutenden Anteil ausmachten, fast 99 Prozent zeigten eine für maligne B-Zellen charakteristische Koexpression von CD 5 und CD 19 vor und nach Stimulation mit CpG-ODN.

Bei positiv selektierten nichtmalignen B-Zellen konnte ebenfalls eine Reinheit von mehr als 98 Prozent erzielt werden.

2. Expression von Oberflächenmolekülen

Nach Inkubation normaler B-Zellen sowie B-CLL-Zellen wurden die Oberflächenmoleküle CD 25, CD 40, CD 54, CD 58, CD 80, CD 86, MHC Klasse I und MHC Klasse II durchflußzytometrisch bestimmt. Stimuliert wurde jeweils mit IL-2 oder DSP 30 bzw. mit beiden gleichzeitig. Als Kontrolloligonukleotid wurde pZ 2 verwendet. Bei jeder Probe wurde auch eine Kontrolle mit alleiniger Zugabe von Medium angesetzt.

Die Ergebnisse sind als MFIR (Mean fluorescence intensity ratio) angegeben, zu deren Berechnung die MFI von Zellen, die mit antigenspezifischen fluorochrommarkierten Antikörpern gefärbt sind, durch die MFI von Zellen, die lediglich mit dem isotypischen Kontrollantikörper markiert sind, dividiert wird. Außerdem wird die MFIR stimulierter Zellen zur MFIR unbehandelter Zellen (Mediumkontrolle) in Relation gesetzt, was dann als MFIR-Induktion (MFIRI) bezeichnet wird. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Eine MFIRI von 1 bedeutet, daß die Fluoreszenzintensität von stimulierten und

unstimulierten Zellen gleich ist, eine MFIRI größer als 1 zeigt eine Zunahme der Fluoreszenz durch Stimulation an.

2.1 FACS-Analyse nach Stimulation mit DSP 30 bzw. Kostimulation mit DSP 30 und IL-2

2.1.1 CD 25-Expression

Die Expression von CD 25 wurde bei 14 B-CLL-Proben sowie bei sechs normalen B-Zell-Proben untersucht.

DSP 30 bewirkte eine Erhöhung der MFIRI für CD 25, bei CLL-Zellen ausgeprägter als bei normalen B-Zellen. Durch zusätzliche Stimulation mit IL-2 konnte die MFIRI bei B-CLL-Zellen mehr als verdoppelt werden, bei normalen B-Zellen zeigte sich nur eine geringgradige Erhöhung.

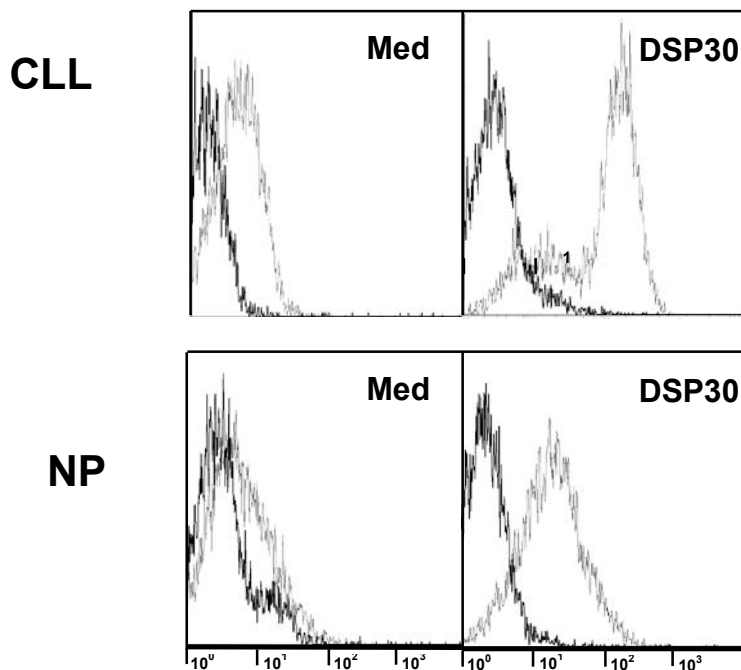


Abbildung 3: Exemplarische Abbildung von FACS-Analysen einer CLL-Probe und einer normalen Probe (NP), gezeigt ist die Fluoreszenzintensität nach Markieren der CD 25-Moleküle (grau unterlegte Diagramme) im Vergleich zur Negativkontrolle nach Stimulation mit Medium und DSP 30

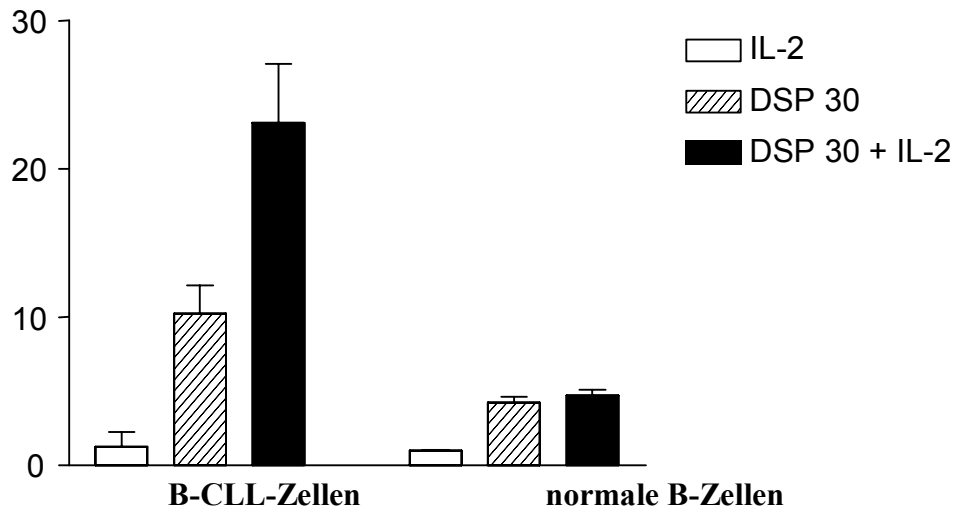


Abbildung 4: CD 25-Induktion bei B-CLL Zellen und normalen B-Zellen nach Stimulation mit IL-2, DSP 30 und Kostimulation mit IL-2 und DSP 30, angegeben ist jeweils der Mittelwert der MFIRI + SEM

2.1.2 CD 40-Expression

Untersucht wurden neun CLL-Proben und vier Proben von Normalpersonen.

Bei der Analyse von CD 40 zeigte sich bei Normalpersonen eine erhöhte Expression nach Stimulation mit DSP 30. Nach Kostimulation mit DSP 30 und IL-2 zeigte sich keine zusätzliche Hochregulierung von CD 40.

Bei CLL-Proben hingegen fand sich bei Kostimulation eine nahezu doppelt so hohe Induktion von CD 40-Molekülen.

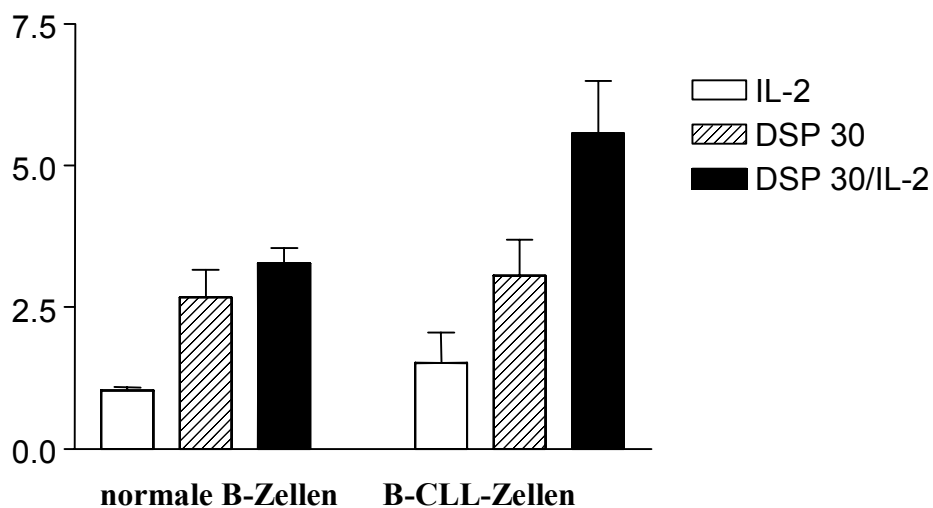


Abbildung 5: CD 40-Induktion bei B-CLL-Zellen und normalen B-Zellen nach Stimulation mit IL-2, DSP 30 und Kostimulation mit IL-2 und DSP 30, angegeben ist der Mittelwert der MFIRI + SEM

2.1.3 CD 54-Expression

Bei vier untersuchten Normalpersonen fand sich eine Stimulierbarkeit der CD 54-Expression durch DSP 30, die durch zusätzliche Stimulation mit IL-2 nur geringgradig erhöht werden konnte. Im Gegensatz dazu war bei den elf CLL-Patienten durch Kostimulation wiederum fast eine Verdoppelung der MFIR-Induktion zu erreichen.

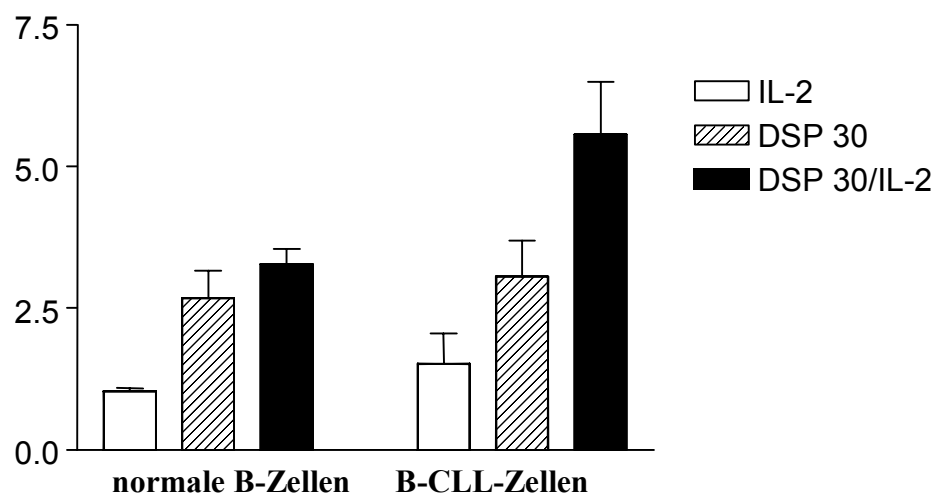


Abbildung 6: CD-54-Induktion bei malignen und nichtmalignen B-Zellen nach Stimulation mit IL-2, DSP 30 und Kostimulation mit IL-2 und DSP 30, angegeben ist jeweils der Mittelwert der MFIRI + SEM

2.1.4 CD 58-Expression

Für LFA-3 war bei normalen B-Zellen (drei Proben) und bei CLL-Zellen (neun Proben) eine Erhöhung der Expression erreichbar, jedoch kein zusätzlicher kostimulatorischer Effekt durch IL-2 zusammen mit DSP 30.

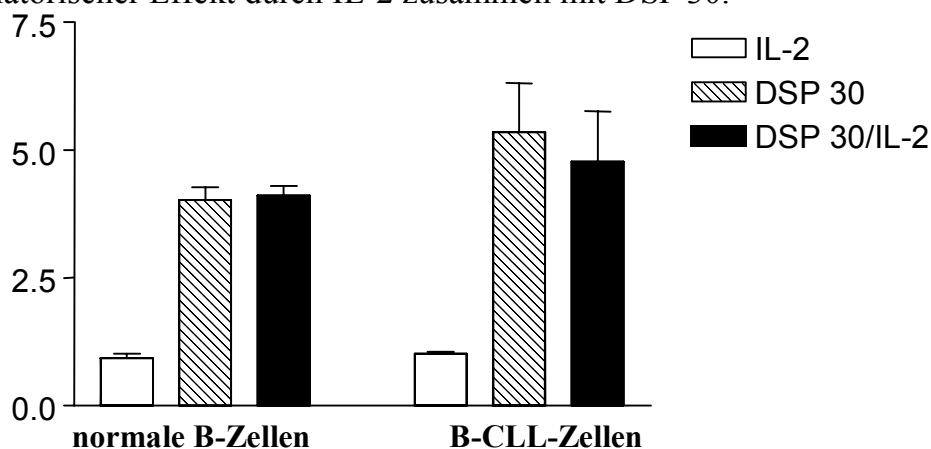


Abbildung 7: CD 58-Induktion bei B-CLL-Zellen und normalen B-Zellen nach Stimulation mit IL-2, DSP 30 und Kostimulation mit IL-2 und DSP 30, angegeben ist jeweils der Mittelwert der MFIRI + SEM

2.1.5 CD 80-Expression

Die Hochregulation von CD 80 war bei CLL-Proben (14 Patienten) sehr ausgeprägt nach Kostimulation mit DSP 30 und IL-2. Bei normalen B-Zellen (sechs Proben) waren durch Kostimulation im Vergleich mit alleiniger Stimulation durch DSP 30 nur geringe zusätzliche Effekte zu erzielen.

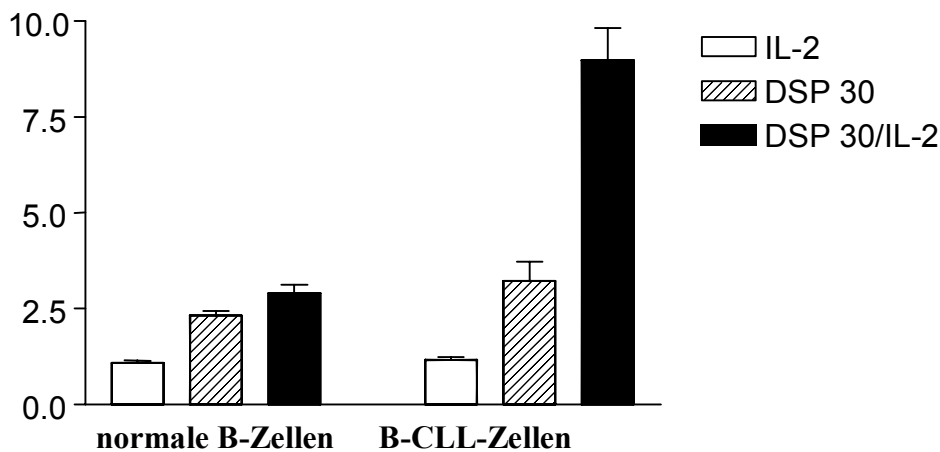


Abbildung 8: CD 80-Induktion bei CLL-Zellen und normalen B-Zellen nach Stimulation mit IL-2, DSP 30 und Kostimulation mit IL-2 und DSP 30, angegeben ist der Mittelwert der MFIRI + SEM

2.1.6 CD 86-Expression

Auch CD 86 wird v. a. bei CLL-Proben (13 Patienten) nach simultaner Stimulation mit IL-2 und DSP 30 vermehrt exprimiert, bei normalen B-Zell-Proben (sechs Proben) konnte keine erhöhte CD 86-Dichte auf der Zelloberfläche im Vergleich zu alleiniger Stimulation mit DSP 30 gezeigt werden.

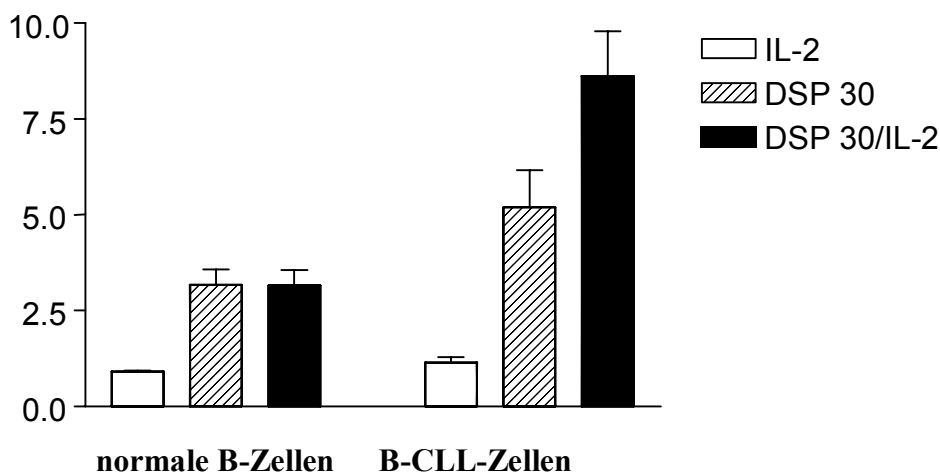


Abbildung 9: CD 86-Induktion bei CLL- und normalen B-Zellen nach Stimulation mit IL-2, DSP 30 und Kostimulation mit IL-2 und DSP 30, angegeben ist der Mittelwert der MFIRI + SEM

2.1.7 MHC-Klasse-I-Expression

Ähnlich verhält sich die Expression von MHC-Klasse I nach Stimulation mit DSP 30 bzw. DSP 30 zusammen mit IL-2. Bei drei Normalpersonen kam es zu einer minimal erhöhten Hochregulierung des MHC-Klasse-I-Moleküls. Bei CLL-Zellen (zehn Proben) führte Kostimulation nahezu zu einer Verdoppelung der MFIRI.

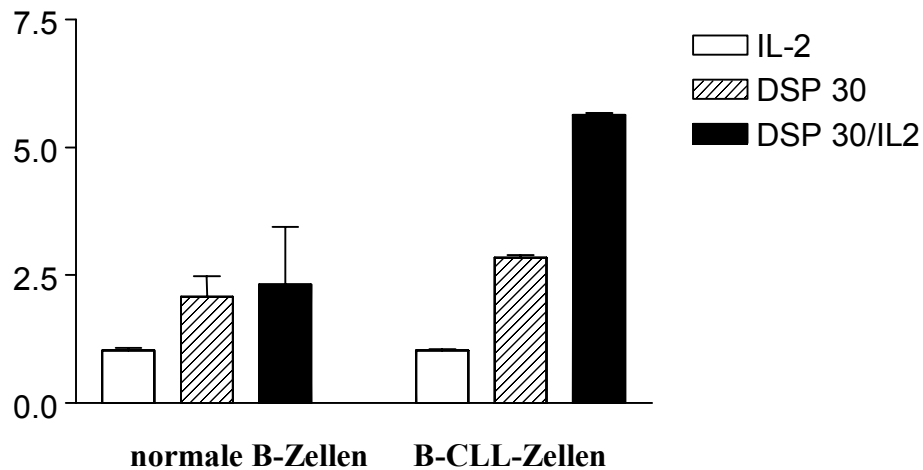


Abbildung 10: MHC-Klasse-I-Induktion bei B-CLL- und normalen B-Zellen nach Stimulation mit IL-2, DSP 30 und Kostimulation mit IL-2 und DSP 30, angegeben ist der Mittelwert der MFIRI + SEM

2.1.8 MHC-Klasse-II-Expression

MHC-Klasse II konnte nach Inkubation mit DSP 30 vermehrt auf der Oberfläche von CLL-Zellen (fünf Proben) detektiert werden, Zugabe von IL-2 resultierte in keiner wesentlichen Steigerung dieses Effektes. Bei normalen B-Zellen wurde die MHC-Klasse II-Expression nicht untersucht.

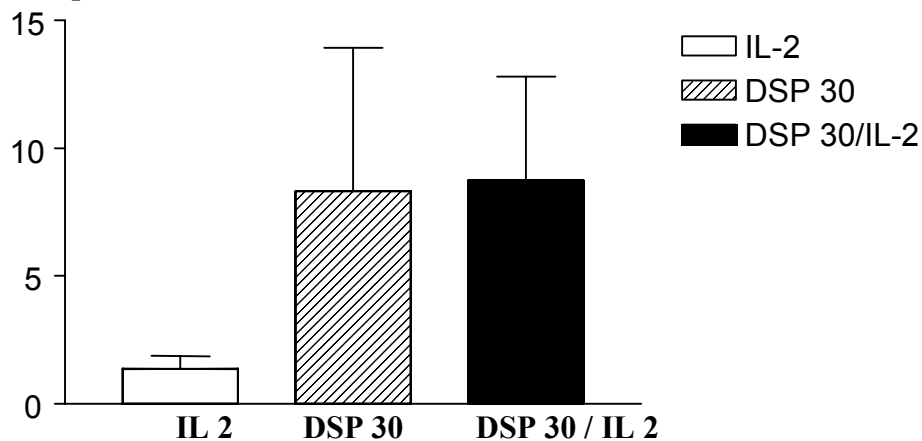


Abbildung 11: MHC-Klasse-II-Induktion bei CLL-Zellen nach Stimulation mit IL-2, DSP 30 und Kostimulation mit IL-2 und DSP 30, angegeben ist der Mittelwert der MFIRI + SEM

2.1.9 Vergleich der MFIRI verschiedener Oberflächenmoleküle nach Stimulation mit DSP 30 und Kostimulation mit DSP 30 und IL-2

CD-Molekül	mittlere MFIRI DSP 30	+/- SEM	mittlere MFIRI DSP30/IL-2	+/- SEM	P-Wert
CD 25	10.26	1.89	23.15	3.93	0.0021
CD 40	6.58	1.37	9.86	2.63	0.22
CD 54	3.06	0.63	5.56	0.93	0.0008
CD 58	5.35	0.96	4.77	0.99	0.42
CD 80	3.32	0.49	8.98	0.84	< 0.0001
CD 86	5.20	0.96	8.62	1.17	0.003
MHC I	2.84	0.05	5.64	0.04	0.037
MHC II	8.32	5.60	8.75	4.06	0.24

Tabelle 2: MFIRI verschiedener CD-Moleküle bei CLL-Zellen, der p-Wert vergleicht alleinige Oligonukleotidstimulation mit Kostimulation durch DSP 30 und IL-2

CD-Molekül	mittlere MFIRI DSP 30	+/- SEM	mittlere MFIRI DSP30/IL2	+/- SEM	P-Wert
CD 25	4.25	0.38	4.73	0.38	0.19
CD 40	2.75	0.66	2.21	0.60	0.16
CD 54	2.67	0.49	3.27	0.28	0.20
CD 58	4.03	0.25	4.11	0.19	0.58
CD 80	2.33	0.11	2.90	0.23	0.06
CD 86	3.17	0.40	3.16	0.39	0.34
MHC I	2.08	0.40	2.32	1.13	0.85

Tabelle 3: MFIR-Induktion bei normalen B-Zellen, der p-Wert vergleicht alleinige Oligonukleotidstimulation mit Kostimulation durch DSP 30 und IL-2

Vergleicht man beide Tabellen, wird deutlich, daß die Induktion der mittleren MFIR nach Stimulation generell bei CLL-Zellen wesentlich höher ist als bei normalen B-Zellen, sie sind also empfänglicher gegenüber einer Stimulation mit Oligonukleotiden. Ein kostimulatorischer Effekt durch Zugabe von IL-2 ist anders als bei B-CLL-Zellen bei normalen B-Zellen kaum nachweisbar. Besonders deutlich ist dieser Effekt bei CLL-Zellen für die Moleküle CD 25, CD 40, CD 80 und CD 86.

2.2. FACS-Analyse nach alleiniger Stimulation von B-Zellen mit IL-2

Wie schon aus den oben angeführten Graphen ersichtlich, wurde auch der Einfluß von alleiniger IL-2-Stimulation auf die Expression von Oberflächenmolekülen mitbestimmt. Die Zahl der untersuchten Zellproben entspricht für jedes CD-Molekül jeweils der in Kap. 2.1 aufgeführten.

Die Inkubation von B-Zellen, sowohl von normalen als auch malignen, mit IL-2 bewirkte im Gegensatz zur Kostimulation mit IL-2 und DSP 30 bei keinem der bestimmten Oberflächenmoleküle eine nennenswerte Zunahme der MFIR, die MFIRI betrug meist ca. 1.

Oberflächen-molekül	mittlere MFIRI	+/- SEM
CD 25	1.26	0.10
CD 40	0.96	0.03
CD 54	1.03	0.06
CD 58	1.02	0.09
CD 80	1.16	0.08
CD 86	1.15	0.14
MHC I	1.03	0.03
MHC II	1.37	0.5

Tabelle 4: MFIRI bei Bestimmung verschiedener CD-Moleküle bei CLL-Proben nach IL-2 – Stimulation

Oberflächenmolekül	Mittlere MFIRI	+/- SEM
CD 25	1.00	0.04
CD 40	0.96	0.03
CD 54	1.03	0.06
CD 58	0.93	0.09
CD 80	1.09	0.06
CD 86	0.97	0.02
MHC I	1.03	0.05

Tabelle 5: MFIR-Induktion bei Bestimmung verschiedener CD-Moleküle bei normalen B-Zellen nach IL-2 -Stimulation

2.3 FACS-Analyse nach Stimulation mit Kontrolloligonukleotiden

Zusätzlich wurden Kontrollanalysen mit Oligonukleotiden bestehend aus Poly A- und Poly G- Sequenzen und dem Nicht-CpG-ODN pZ 2 durchgeführt.

Bei drei untersuchten CLL Proben fand sich weder durch Poly A - noch durch Poly G - Sequenzen eine wesentliche MFIR-Induktion für CD 25 oder CD 80, die mittlere MFIRI betrug um 1.0.

pZ 2 führte bei zwei untersuchten CLL-Proben zu einer marginalen Erhöhung der MFIR.

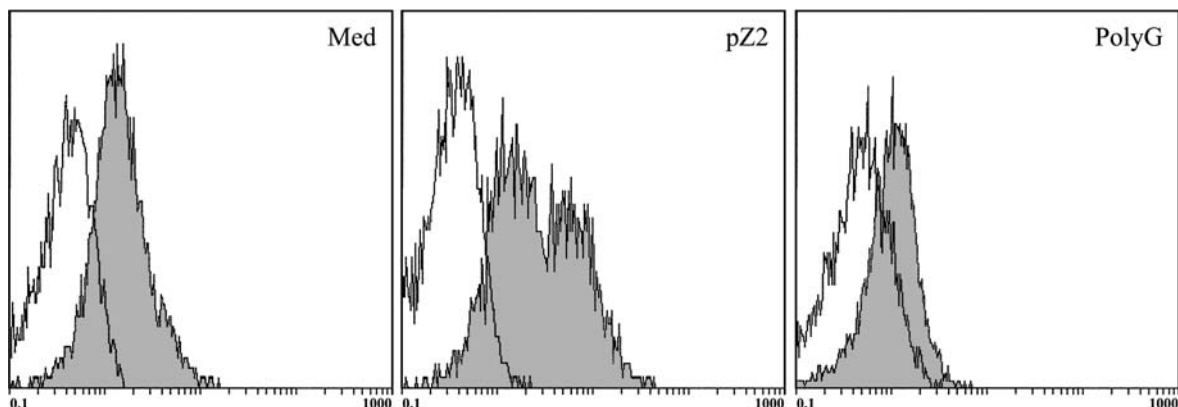


Abbildung 12: Exemplarische FACS-Analyse einer Mediumkontrolle sowie nach pZ 2- und Poly G-Stimulation einer CLL-Probe, gezeigt ist die Fluoreszenzintensität nach Markieren der CD-25-Moleküle (grau unterlegte Diagramme) im Vergleich zur Negativkontrolle

3. Proliferation von normalen und malignen B-Zellen nach Stimulation

Bei elf CLL-Proben und sechs Proben von normalen B-Zellen wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Dabei wurde der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die B-Zell-DNA gemessen.

Als eine Konsequenz der Stimulation mit DSP 30 bzw. Kostimulation mit IL-2 war eine Zunahme der Proliferationsrate nachweisbar. Im Proliferationsassay konnte durch eine alleinige Stimulation mit IL-2 bei normalen und auch malignen B-Zellen kaum DNA-Synthese induziert werden. DSP 30 bewirkte bei normalen B-Zellen eine signifikant höhere Thymidininkorporation als bei CLL-Zellen ($p = 0.04$), durch Kostimulation mit IL-2 konnte allerdings bei CLL-Zellen ein ebenso ausgeprägter Effekt erzielt werden wie bei normalen B-Zellen, der jeweils über dem durch DSP 30 alleine erzielbaren lag.

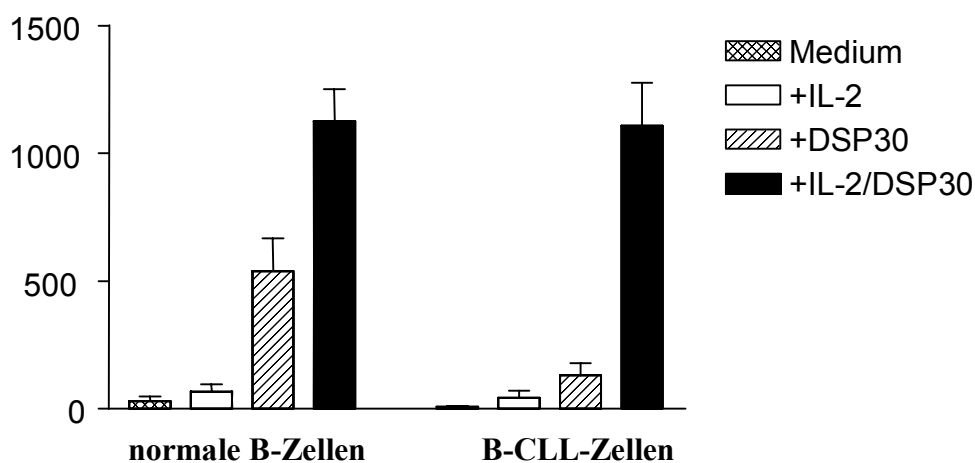


Abbildung 13: Proliferation von B-CLL- und normalen B-Zellen nach Inkubation mit Medium, IL-2, DSP 30 oder DSP 30 mit IL-2, Angaben als Mittelwert + SEM in cpm (Zerfälle pro Minute)

In drei unabhängigen Versuchen führte Inkubation mit dem Nicht-CpG-Oligonukleotid pZ 2 zu keiner Proliferation von CLL-Zellen. Kostimulation mit pZ 2 und IL-2 bewirkte eine minimale Zunahme des Thymidineinbaus.

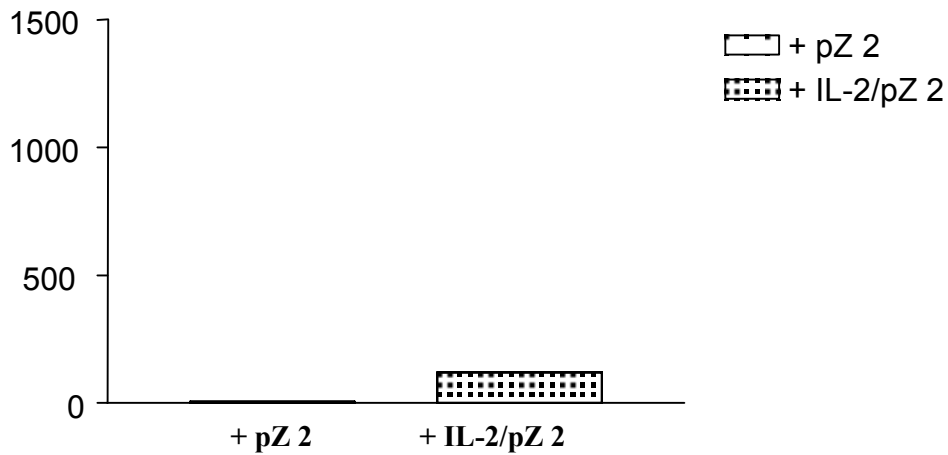


Abbildung 14: Proliferation einer repräsentativen B-CLL-Probe nach Stimulation mit dem Kontrolloligonukleotid pZ 2 und Kostimulation mit pZ 2 und IL-2

4. Produktion von Immunglobulin M und den Zytokinen IL-6, TNF α und IL-8

4.1 Ig M-Synthese nach Stimulation

Die Ig M-Synthese wurde bei sechs normalen B-Zell-Proben und 16 CLL-Proben nach neuntägiger Kultur untersucht.

Durch Zugabe von IL-2 konnte der durch DSP 30 verursachte Anstieg der Immunglobulinkonzentration im Überstand weiter erhöht werden, der Effekt war jedoch bei CLL-Zellen nicht ausgeprägter als bei normalen B-Zellen. Die Ig M-Produktion verglichen nach alleiniger DSP 30-Stimulation oder Kostimulation mit DSP 30 und IL-2 unterschied sich weder bei normalen B-Zellen ($p = 0.20$) noch bei malignen B-Zellen ($p = 0.12$) signifikant.

Weder Inkubation mit dem Kontrolloligonukletid AP1 noch Kostimulation mit AP1 und IL-2 führte zu einer Erhöhung der Ig-M-Sekretion bei drei unabhängigen B-CLL-Proben.

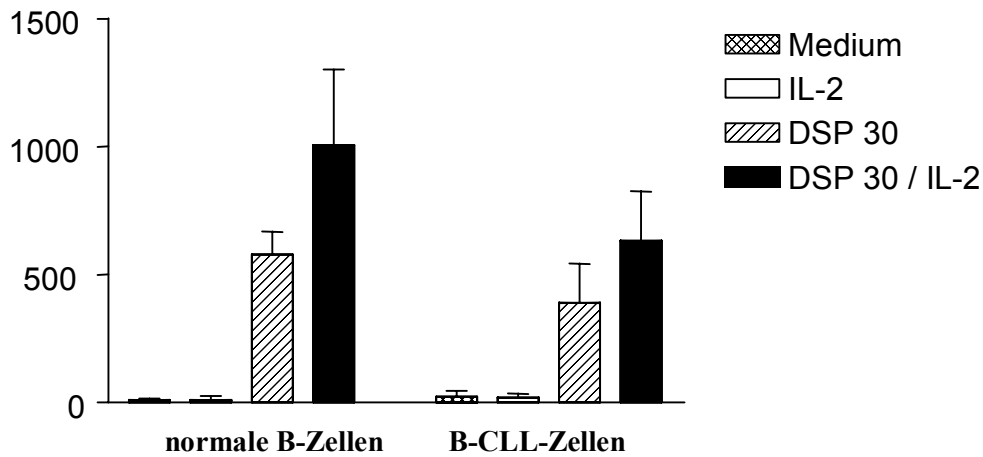


Abbildung 15: Ig M-Synthese bei Inkubation mit Medium, IL-2, DSP 30 oder DSP 30 mit IL-2, angegeben ist der Mittelwert der Immunglobulinkonzentration im Kulturüberstand in ng/ml + SEM

4.2 IL-6-Synthese nach Stimulation

Die Konzentration von IL-6 wurde im Überstand von 14 CLL-Zell-Kulturen und von sechs normalen B-Zell-Kulturen nach 48-stündiger Inkubation gemessen.

In Gegenwart von Medium oder IL-2 wurde von beiden Zelltypen kaum IL-6 sezerniert. Inkubation mit DSP 30 führte v. a. bei normalen B-Zellen zu einem Anstieg der IL-6-Konzentration im Überstand. Der kostimulatorische Effekt durch IL-2 war bei B-CLL-Zellen besonders ausgeprägt. Hier war der Unterschied zwischen DSP 30-Stimulation und Kostimulation mit DSP 30 und IL-2 statistisch signifikant ($p = 0.002$) im Gegensatz zu normalen B-Zellen ($p = 0.14$). Weder pZ 2 noch pZ 2 kombiniert mit IL-2 verursachten eine Erhöhung des Interleukinspiegels in drei unabhängigen Versuchen.

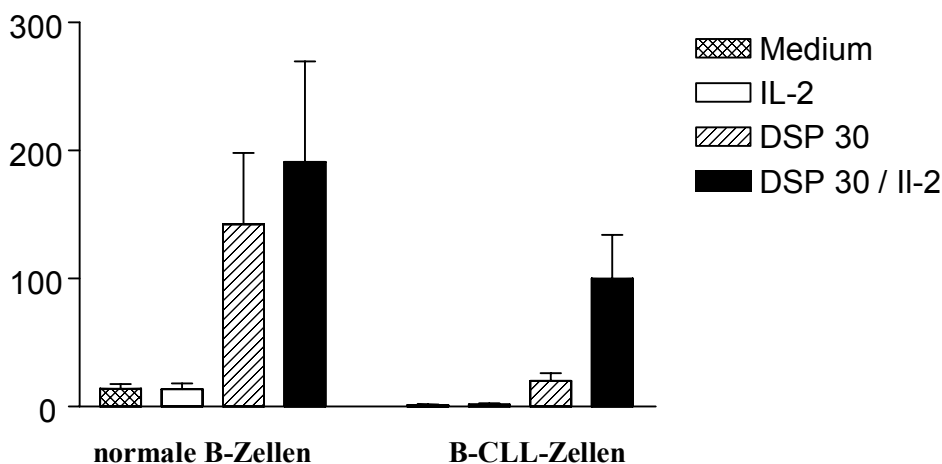


Abbildung 16: IL-6-Produktion durch normale B-Zellen und B-CLL-Zellen nach Inkubation mit Medium, IL-2, DSP 30 oder DSP 30 mit IL-2, Angaben als Mittelwert in pg/ml +SEM

4.3 TNF α -Synthese nach Stimulation

Die Produktion von TNF α wurde für neun CLL-Proben sowie für sechs normale B-Zell-Proben nach 48-stündiger Kultur ermittelt.

Durch IL-2-Stimulation und in der Mediumkontrolle kam es bei beiden Zellarten zu keiner nachweisbaren Sekretion von TNF α . DSP 30 vermochte die TNF α -Produktion bei normalen und malignen Zellen zu stimulieren. Die absoluten Werte waren bei normalen B-Zellen höher, eine zusätzliche Steigerung der Zytokinkonzentration im Überstand durch Kostimulation mit IL-2 war jedoch nur bei B-CLL-Zellen in höherem Ausmaß möglich. Weder bei CLL-Zellen ($p = 0.15$) noch bei normalen B-Zellen ($p = 0.65$) war der Unterschied zwischen DSP 30-Stimulation und Kostimulation mit DSP 30 und IL-2 statistisch signifikant.

Durch Stimulation mit dem Kontrolloligonukleotid pZ 2 konnten in drei unabhängigen Versuchen keine meßbaren TNF α -Spiegel erreicht werden, auch nicht nach Zugabe von IL-2.

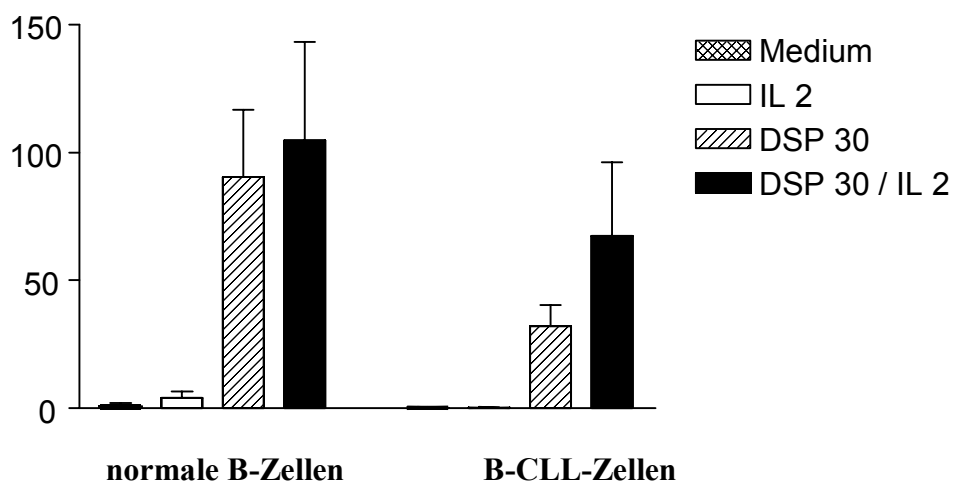


Abbildung 17: TNF α -Konzentration im Zellüberstand nach Inkubation mit Medium, IL-2, DSP 30 oder DSP 30 mit IL-2 bei normalen und malignen B-Zellen, Angaben als Mittelwert + SEM in pg/ml

4.4 IL-8-Synthese nach Stimulation

Die Produktion von IL-8 wurde nach 48-stündiger Kultur bei vier normalen B-Zell-Proben und bei sechs CLL-Proben untersucht.

Bei letzteren war weder im Überstand von IL-2-stimulierten Zellen noch nach DSP 30- oder Kostimulation eine Erhöhung der IL-8-Sekretion gegenüber der Mediumkontrolle nachzuweisen. Die Werte lagen durchschnittlich bei ca. 85 pg/ml.

Bei normalen B-Zell-Proben fand sich eine wesentlich höhere IL-8-Sekretion, die in der Mediumkontrolle im Bereich von ca. 2000 pg/ml lag, allerdings zeigte sich ebensowenig eine Stimulierbarkeit durch DSP 30, IL-2 oder beide in Kombination.

5. Ergebnisse der RT-PCR

Für CLL-Zellen von zwei Patienten wurde jeweils die Transkription von IL-6 und TNF α -DNA auf mRNA-Ebene nachgewiesen. B-CLL-Zellen wurden unter den in Kapitel IV erwähnten Bedingungen 24 und 48 Stunden kultiviert, wobei mit IL-2, DSP 30, IL-2 zusammen mit DSP 30, dem Kontrolloligonukleotid AP 1 und AP 1 zusammen mit IL-2 stimuliert wurde. Ein Nullwert mit unstimulierten Zellen wurde weggefroren und später zum Ausschluß des Vorhandenseins von IL-6- oder TNF α -mRNA im unstimulierten Zustand oder einer Kontamination mitgeführt. Als Kontrolle für eine erfolgreiche reverse Transkription sowie als Beladungskontrolle wurde die mRNA des ubiquitären β -Aktin bestimmt.

5.1 β -Aktin - PCR

Bei beiden Versuchen war in jeder Stimulation sowie beim Nullwert β -Aktin-mRNA nach 24 und nach 48 Stunden nachzuweisen, die reverse Transkription war somit erfolgreich.

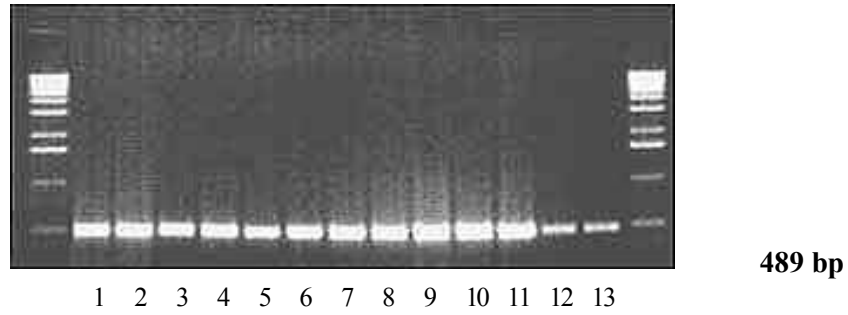


Abbildung 18: β -Aktin-PCR bei Versuch 1, von links nach rechts sind aufgetragen:

- | | | | |
|-----|---------------------------------|---|------------------------------|
| 1. | Nullwert | } | nach 24-stündiger Inkubation |
| 2. | Stimulation mit Medium | | |
| 3. | Stimulation mit IL-2 | | |
| 4. | Stimulation mit DSP 30 | | |
| 5. | Stimulation mit DSP 30 und IL-2 | | |
| 6. | Stimulation mit AP 1 | | |
| 7. | Stimulation mit AP 1 mit IL-2 | | |
| 8. | Stimulation mit Medium | } | nach 48-stündiger Inkubation |
| 9. | Stimulation mit IL-2 | | |
| 10. | Stimulation mit DSP 30 | | |
| 11. | Stimulation mit DSP 30 und IL-2 | | |
| 12. | Stimulation mit AP 1 | | |
| 13. | Stimulation mit AP 1 und IL-2 | | |

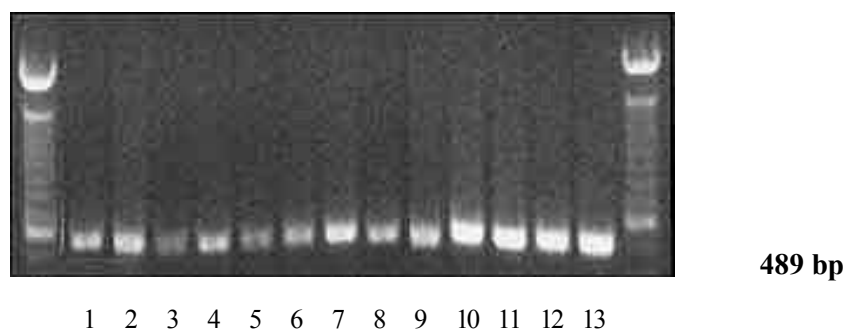
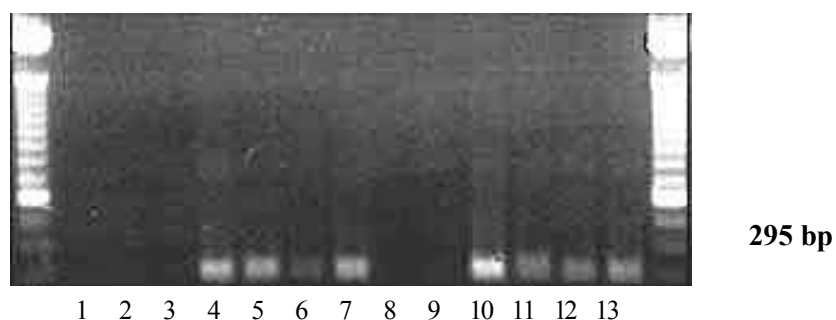
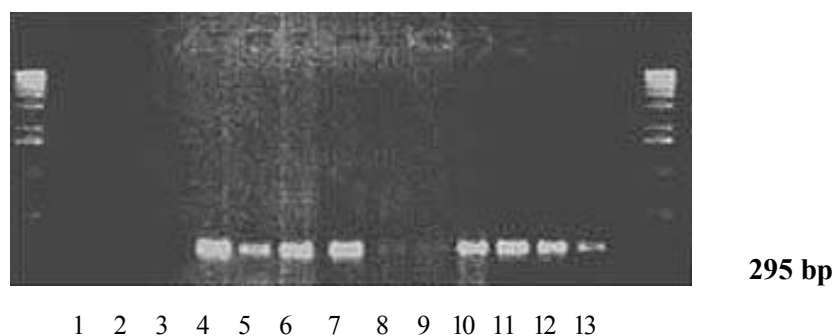


Abbildung 19: β -Aktin-PCR, Versuch 2, Auftragerihenfolge siehe Abb. 18

5.2 IL-6 - PCR

IL-6 mRNA konnte bei beiden Patienten nach Stimulation mit DSP 30, Kostimulation mit DSP 30 und IL-2, allerdings auch nach Stimulation mit dem Kontrolloligonukleotid AP 1 und Kostimulation mit AP 1 und IL-2 nachgewiesen werden. IL-2 alleine bewirkte keine Transkription, Mediumkontrollen und Nullwert waren negativ. Die Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden unterschieden sich nicht.

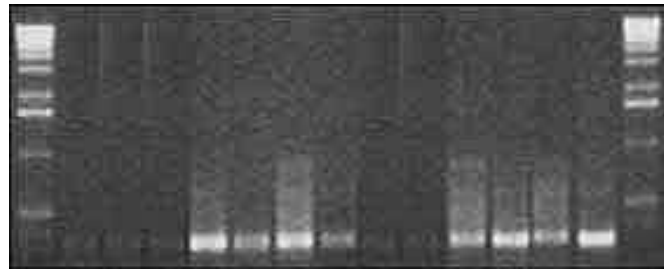


Abbildungen 20 und 21: IL-6-PCR Auftragsreihenfolge siehe Abbildung 18

5.3 TNF α - PCR

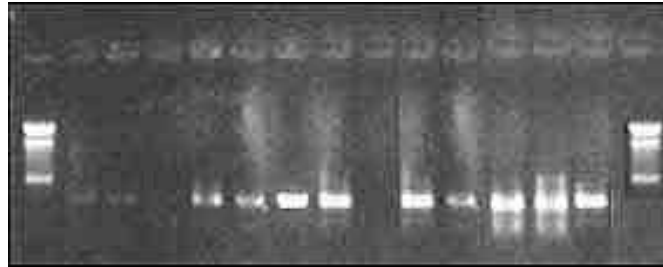
TNF α -mRNA konnte ebenfalls nach Stimulation mit DSP 30, DSP 30 und IL-2, AP 1 sowie AP 1 und IL-2 nachgewiesen werden, nach 48 Stunden Kultivierungsdauer war TNF α -mRNA auch nach alleiniger Stimulation mit IL-2 zu detektieren.

Mediumkontrollen und Nullwert waren jeweils negativ.



330 bp

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



330 bp

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Abbildungen 22 und 23: TNF α - PCR bei V 1 und V 2, Auftragsreihenfolge siehe Abbildung 18

VI Diskussion

B-CLL-Zellen zeichnen sich aus durch eine lange Lebenszeit bedingt durch Arretierung in der G₀-Phase des Zellzyklus (Caligaris-Cappio, 1988, S. 323) und durch Defekte im B-Zell-Rezeptor, die zu einer gegenüber normalen B-Zellen verminderten Proliferation auf mitogene Reize führen (Nilsson, 1992, S. 33).

Diese Blockade in der Zellreifung kann z. B. durch IL-2 in Kombination mit SAC aufgehoben werden (Fluckiger et al., 1992, S. 3178). Auch CpG-Oligonukleotide haben antigenunspezifische stimulatorische Wirkung auf B-Zellen (Hartmann et al., 2000, S. 949). Man kann also eine CpG-ODN-induzierte Stimulierbarkeit bei B-CLL-Zellen vermuten, die durch IL-2 sogar noch verstärkt werden könnte.

Die Fragestellung dieser Arbeit war, wie B-CLL-Zellen auf Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden, IL-2 oder Kostimulation mit beiden Substanzen reagieren und wie sich das Verhalten von B-CLL-Zellen von dem normaler B-Zellen unterscheidet.

1. Expression von Oberflächenmolekülen nach Stimulation

Durch FACS-Analyse wurden CD 25 (α -Komponente des IL-2-Rezeptors), sowie die kostimulatorischen Moleküle CD 40, CD 54 (ICAM-1), CD 58 (LFA-3), CD 80 (B7-1) und CD 86 (B7-2) nachgewiesen.

CD 25 ist die α -Komponente des IL-2-Rezeptors, die in den Komplex aus β - und γ_c -Kette zur Ausbildung des Rezeptors mit hoher Affinität integriert werden muß (Kondo et al., 1994, S. 2026). Bei B-Zellen führt Aktivierung des IL-2-Rezeptors zu Progression im Zellzyklus mit Proliferation (Tsudo et al., 1984, S. 612) und Ig M-Sekretion (Nakanishi et al., 1984, S. 1605).

Durch Stimulation mit CpG-ODN konnte bei normalen und malignen B-Zellen die Expression von CD 25 auf der Zelloberfläche erhöht werden, wobei der Effekt bei B-CLL-Zellen deutlich stärker war als bei normalen B-Zellen. (MFIRI CLL-Zellen: 10.26, MFIRI normale B-Zellen: 4.25). Bei B-CLL-Zellen kam es bei Kostimulation

mit DSP 30 und IL-2 zur weiteren Erhöhung der CD 25-Dichte auf der Zelloberfläche, bei normalen B-Zellen bewirkte Kostimulation keinen zusätzlichen Effekt.

Ursächlich dafür könnten verschiedene Signaltransduktionswege in normalen und malignen B-Zellen nach Inkubation mit CpG-ODN sein wie sie auch für andere Zelltypen beschrieben sind (Häcker et al., 1999, S. 6973). Auch eine unterschiedliche Anzahl von IL-2-Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität oder Unterschiede auf Postrezeptorebene sind mögliche Gründe. Bei CLL-Zellen kann man im Gegensatz zu normalen B-Zellen eine Phosphorylierung der Serinreste 727 der STAT 1- und STAT 2-Proteine feststellen (Frank et al. 1997, S. 3140). Serin-Phosphorylierung ist zwar nicht ausreichend, STAT-Proteine zu aktivieren, kann aber die Gen-Transkription durch tyrosin-phosphorylierte STAT-Proteine verbessern (Wen et al., 1995, S. 241). Darin könnte die ausgeprägtere Koaktivierung bei CLL-Zellen begründet sein..

Da IL-2 wiederum IL-2R α auf der Lymphozytenoberfläche induziert (Begley et al., 1990, S. 265), kommt es durch ein positives Feed-Back zu einer weiteren Erhöhung der IL-2R α -Dichte auf B-CLL-Zellen.

Auch von TNF α , welches nach CpG-ODN- und IL-2-Stimulation vermehrt sezerniert wird, ist bekannt, daß es als Mediator für die erhöhte CD-25-Expression auf B-CLL-Zellen in Frage kommt (Trentin et al., 1994, S. 4249).

Durch erhöhte IL-2-R α -Expression sind B-CLL-Zellen vermehrt suszeptibel gegenüber Stimulation bzw. Kostimulation mit IL-2 und erwünschte IL-2-Effekte wie Progression im Zellzyklus bei den ansonsten in der G₀-Phase des Zellzyklus verweilenden Zellen (Reed, 1998, S. 14) können erzielt werden.

Die physiologische Funktion von CD 40 besteht darin, bei der T-Zell-abhängigen B-Zell-Aktivierung antigenaktivierten B-Zellen ein zusätzliches Signal zu übermitteln, das sie für ihre vollständige Aktivierung benötigen (Noelle et al., 1990, S. 361). CD 40 auf B-Zellen bindet auf CD 40-Ligand auf T₄-Zellen und es kommt zu B-Zell-Proliferation, Differenzierung und Ig-Sekretion (Banherau et al. 1991, S. 678).

Bei Stimulation von normalen und malignen B-Zellen mit CpG-ODN kam es zu einer Zunahme der CD 40-Expression, durch Zugabe von IL-2 konnte nur bei CLL-Zellen nahezu eine Verdoppelung dieses Effektes erzielt werden.

Als Ursachen kommen wieder die schon oben erwähnten Unterschiede in CpG-ODN- und IL-2-vermittelter Signaltransduktion in Betracht.

Obwohl CLL-Zellen alterierte Immunglobuline auf ihrer Oberfläche tragen (Todd et al., 1997, S. 325), sind sie schlechte Stimulatoren in MLRs (Mixed Lymphocyte Reactions) (Dazzi et al., 1995, S. 28), wohl bedingt durch die geringe Dichte an den kostimulatorischen B7-1- und B7-2-Molekülen (Dazzi et al., 1995, S. 29) und an Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und LFA-3) auf der Zelloberfläche. Über CD 40/CD 40L können aktivierte T-Zellen allerdings eine Erhöhung der B7-Molekül-Expression (Ranheim et al., 1993, S. 929, Van den Hove et al., 1997, S. 575) sowie der Expression von ICAM-1 und LFA-3 (Buhmann et al., 1999, S. 1996) auf der CLL-Zell-Oberfläche bewirken.

Die erhöhte Expression von CD 40 nach Stimulation mit CpG-ODN führt zudem zu einer verstärkten Proliferation und Zytokinsekretion nach CD 40-Ligand-Bindung (Decker et al., 2000, S. 999).

Eine Zunahme von zytotoxischen T-Zellen, die durch IL-2 Zugabe weiter gesteigert werden konnte, wurde nach Stimulation von Zellen eines follikulären Lymphoms über CD 40 beschrieben (Schultze et al., 1997, S. 3809).

CD 54 (ICAM-1) dient als Adhäsionsmolekül von stimulierten Zellen über Bindung an den Rezeptor LFA-1 auf T-Lymphozyten und anderen Leukozyten (Makgoba et al., 1988, S. 67) sowie als kostimulatorisches Signal zur Aktivierung von T-Zellen (Van Seventer et al., 1990, S. 4579), v. a. von CD 8+-Zellen (Deeths et al., 1999, S. 48).

Nach Inkubation mit CpG-ODN sowohl von normalen B-Zellen als auch von B-CLL-Zellen konnte Zunahme der CD 54-Expression nachgewiesen werden, eine zusätzliche Hochregulierung durch Zugabe von IL-2 war nur bei CLL-Zellen deutlich, der Unterschied zu normalen B-Zellen war aber nicht statistisch signifikant.

B-CLL-Zellen, die bekanntlich verschiedene antigene Determinanten wie beispielsweise Veränderungen des Zytoskelettes (Caligaris-Cappio et al., 1986, S. 233) oder des Oberflächenimmunoglobulins (Cohen et al., 1975, S. 84) aufweisen und HLA I-Moleküle exprimieren (Todd et al., 1997, S. 235), könnten durch CpG-ODN- und IL-2-vermittelte Steigerung der ICAM-1-Expression nun CD 8+-T-Zellen vermehrt stimulieren.

Auch CD 58 (LFA-3) ist ein Adhäsionsmolekül mit stimulatorischer Komponente (Van der Weil, van den Kemenade et al., 1992, S. 1467).

CpG-ODN-Stimulation führte bei beiden B-Zell-Typen zu erhöhter Dichte auf der Zelloberfläche, durch Zugabe von IL-2 ließ sich aber kein zusätzlicher Effekt erzielen. Auch die erhöhte Dichte von CD 58 könnte zu einer Stimulation von T-Zellen durch B-CLL-Zellen beitragen.

CD 80 (B7-1) ist ein wichtiges kostimulatorisches Molekül, das als zweites Signal, welches zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen nötig ist, dienen kann (Lenschow et al., 1996, S. 233). Die niedrige Anzahl von B7-Molekülen wird sogar für das Versagen von B-CLL-Zellen als APC verantwortlich gemacht (Dazzi et al., 1995, S. 30).

Gerade in der Beeinflussung der CD 80-Expression zeigten sich CpG-ODN zusammen mit IL-2 bei B-CLL-Zellen als sehr effizientes Stimulans, zwar fand sich auch bei normalen B-Zellen ein additiver Effekt nach IL-2-Zugabe zu CpG-ODN-inkubierten Zellen, bei B-CLL-Zellen war der kostimulatorische Effekt jedoch sehr ausgeprägt.

Somit könnte durch CpG-ODN/IL-2-Kostimulation von B-CLL-Zellen mit konsekutiv erhöhter B7-1-Expression Immuntoleranz gegenüber dem malignen Zellklon verhindert werden wie dies für nichtmaligne Mäuse-B-Zellen beschrieben wurde (Yuschenkoff et al., 1996, S. 1987). Zudem könnte die APC-Funktion von B-CLL-Zellen durch Kostimulation mit CpG-ODN/IL-2 wiederhergestellt werden. Plumas und Chaperot haben die Stimulation von T-Zellen in allogenen Mixed Lymphocyte Reactions mit CD 80- und CD-86-exprimierenden Non-Hodgkin-Lymphom-Zellen beschrieben (Plumas et al., 1995, S. 3337, Chaperot et al., 1999, S. 479). Auch CD 80-transfizierte AML-Zellen (akute myeloische Leukämie) vermögen allogene T-Zellen zu stimulieren (Mutis et al., 1998, S. 1677).

B7-1 scheint einen etwas stärkeren Stimulus als B7-2 für naive CD 8⁺-Zellen darzustellen (Fields et al., 2008, S. 5271).

CD 86 (B7-2) ist ebenso wie CD 80 ein kostimulatorisches Molekül, das an CD 28 auf B-Zellen bindet und T-Zellen aktiviert (Lenschow et al., 1996, S. 233).

Bei CpG-ODN/IL-2-Stimulation von B-CLL-Zellen zeigte sich ein gegenüber alleiniger CpG-ODN-Stimulation zusätzlicher kostimulatorischer Effekt, der bei normalen B-Zellen nicht nachweisbar war.

Auch für CD 86 wurde gezeigt, daß es zur Immunogenität von malignen NHL-B-Zellen führt (Plumas et al., 1995, S. 3332, Chaperot et al., 1999, S. 479).

Im Widerspruch dazu stehen Ergebnisse von Stremmel et al., die gezeigt haben, daß B7-2-Moleküle anders als B7-1-Moleküle auf manchen Tumorzellen, nämlich T-Zell-Thymom-Zellen, eine Suppression von Antitumor-Immunität bewirken können (Stremmel et al., 1999, S. 923). Für CpG-ODN-stimulierte B-CLL-Zellen konnte jedoch eine Aktivierung von allogenen und autologen T-Zellen in mixed lymphocyte reactions nachgewiesen werden (Decker et al., 2000, S.1004).

Die Präsentation von Antigenen an T-Zellen erfolgt unter MHC-Restriktion. Extrazelluläre Proteine, z. B. bakterielle, werden intrazellulär prozessiert und zusammen mit MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Zelloberfläche CD 4⁺-Zellen, v. a. T-Helferzellen, präsentiert und somit eine humorale Abwehrreaktion initiiert (Unanue et al., 1992, S.63). Als antigenpräsentierende Zellen fungieren dabei dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten u. a.. Intrazelluläre Proteine hingegen, die von den Zellen selbst synthetisiert werden, werden auf allen kernhaltigen Zellen zusammen mit MHC-Klasse-I-Molekülen CD 8⁺-Zellen, im wesentlichen an cytotoxische T-Zellen, präsentiert, wodurch eine Abwehr von viralen und Tumorantigenen möglich wird (York et al., 1996, S. 369).

Bei Stimulation mit CpG-ODN kam es bei CLL-Zellen zu einer deutlichen Zunahme der MHC-Klasse-I-Moleküle, die durch IL-2 im Gegensatz zu normalen B-Zellen noch weiter gesteigert werden konnte.

Auch MHC-Klasse-II-Moleküle konnten vermehrt auf B-CLL-Zellen nach Inkubation mit CpG-ODN nachgewiesen werden, allerdings konnte durch IL-2 kein kostimulatorischer Effekt erzielt werden.

Durch die erhöhten Dichten sowohl von MHC-Klasse-I- als auch MHC-Klasse-II-Molekülen wird die APC-Funktion von B-CLL-Zellen verbessert. Neben der vermehrten Expression von kostimulatorischen Molekülen könnte die erhöhte

Expression von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen zu einer verstärkten Immunantwort auf B-CLL-Zellen führen.

Der IL-2-Rezeptor mit hoher Affinität wird auf normalen B-Zellen erst nach Aktivierung, z. B. durch BCR-Bindung (Bich-Thuy et al., 1985, S. 1075) oder IL-2 selbst (Begley et al., 1990, S. 265) induziert. Von B-CLL-Zellen exprimieren die Hälfte der Fälle das CD 25-Molekül und reagieren spontan auf IL-2 (Touw et al., 1987, S. 1669, Hivroz et al., 1986, S. 1001).

Alleinige Stimulation mit IL-2 zeigte jedoch weder bei normalen noch bei malignen B-Zellen einen wesentlichen Einfluß auf die Hochregulierung von Oberflächenmolekülen.

Nach CpG-induzierter Erhöhung des CD 25-Antigens, die bei CLL-Zellen deutlich ausgeprägter als bei normalen B-Zellen ist, wird ein kostimulatorischer Effekt bei IL-2-Koaktivierung nur bei CLL-Zellen deutlich, die im Gegensatz zu normalen B-Zellen schon im Ruhezustand hochaffine IL-2-Rezeptoren exprimieren. Für unstimulierte CLL-Zellen ist bekannt, daß sie heterogen auf IL-2 reagieren (Karray et al., 1987, S. 1105, Hivroz et al., 1986, S. 1001), was dadurch verursacht sein kann, daß die in älteren Arbeiten verwendeten B-CLL-Zellen bedingt durch die Aufreinigungstechnik häufig mit T-Zellen kontaminiert waren, die auf IL-2 reagierten. Es könnten aber auch zufällig B-CLL-Proben ausgewählt worden sein, die nicht spontan auf IL-2 reagieren. Der IL-2 Effekt ist bei malignen B-Zellen stark von Kostimulation abhängig (Karray et al., 1987, S. 1008), die in dieser Arbeit durch CpG-ODN gegeben ist.

2. Proliferation

Proliferationsreize für B-Zellen sind BCR-Bindung und CD 40-Ligation (Banchereau et al., 1992, S. 125) aber auch IL-2 (Nelson et al., 1998, S. 14) und CpG-ODN (Liang et al., 1996, S. 1119).

Im Proliferationsassay zeigte sich, daß die CpG-ODN-induzierte Thymidininkorporation bei normalen B-Zellen wesentlich höher ist als bei malignen B-Zellen. Durch Kostimulation mit IL-2 konnte allerdings bei B-CLL-Zellen eine ebenso ausgeprägte Proliferation wie bei normalen B-Zellen erreicht werden.

Kostimulation scheint also eine Möglichkeit zu sein, das verminderte Ansprechen von B-CLL-Zellen auf proliferative Reize, wie es auch für BCR-Rezeptor-Bindung bekannt ist (Nilsson, 1992, S. 33), zu umgehen. Bei B-CLL-Zellen findet man eine eingeschränkte Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivität (Lankester et al., 1995, S. 1090), die durch konstitutionelle Veränderungen in der IL-2-initiierten Signaltransduktion (Frank et al., 1997, S. 3140) eventuell umgangen werden kann.

Da $\text{TNF}\alpha$ einen autokrinen Wachstumsfaktor für B-CLL-Zellen darstellt, (Cordingley et al., 1988, S. 969) wäre auch eine $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Proliferation von B-CLL-Zellen nach Koaktivierung mit CpG-ODN und IL-2 möglich. $\text{TNF}\alpha$ wird nach Kostimulation vermehrt von malignen B-Zellen sezerniert.

3. Immunglobulin- und Zytokinsynthese

Aktivierte B-Zellen produzieren zunächst Immunglobulin der Klasse M, bevor sie auf andere Immunglobulinklassen umschalten (Banchereau et al., 1992, S. 125).

Durch Kostimulation mit IL-2 konnte die durch CpG-ODN allein erzielte IgM-Sekretion sowohl bei normalen als auch bei malignen B-Zellen erhöht werden, generell produzierten B-CLL-Zellen jedoch weniger IgM.

Der Nachweis einer Erhöhung der Sekretion von Ig M wird als Zeichen der Differenzierung interpretiert.

IL-6 verhindert $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Proliferation von B-CLL-Zellen (Reittie et al., 1996, S. 83). Zudem wird vermutet, daß es einer Progression bei CLL entgegenwirkt, da bei fortgeschrittenen Krankheitsstadien IL-6 in niedrigeren Konzentrationen nachgewiesen werden konnte als bei Anfangsstadien (Hulkkonen et al., 1998, S. 478).

Im ELISA war die IL-6 Konzentration bei B-CLL-Zellen zwar jeweils niedriger als bei normalen B-Zellen, durch Kostimulation mit CpG-ODN und IL-2 konnte bei malignen B-Zellen aber eine signifikante Erhöhung der IL-6-Sekretion erzielt werden. In der PCR konnte dieser quantitative Unterschied nicht nachgewiesen werden, jedoch die Induktion von IL-6-mRNA durch CpG-ODN und CpG-ODN mit IL-2 im Gegensatz zur alleinigen IL-2-Stimulation.

Die CpG-ODN- und IL-2-verursachte Erhöhung der IL-6 Produktion durch B-CLL-Zellen könnte aus oben genannten Gründen eine Progression bei B-CLL verlangsamen.

TNF α wird als auto- und parakriner Wachstumsfaktor für B-CLL-Zellen diskutiert (Cordingley et al., 1988, S. 969, Van Kooten et al., 1992, S. 1299).

Im ELISA führte CpG-ODN-Stimulation bei beiden Zellarten zu einer Erhöhung der TNF α -Sekretion mit höheren absoluten TNF α -Konzentrationen bei normalen B-Zellen, ein additiver Effekt nach IL-2-Zugabe war bei CLL-Zellen deutlicher. Alleinige IL-2-Stimulation führte zu keiner nachweisbaren TNF α -Sekretion. In der PCR konnten diese Ergebnisse qualitativ reproduziert werden, TNF α -m-RNA war jedoch nach 48 Stunden Inkubation mit IL-2 zu detektieren, ein Zeitpunkt, zudem wahrscheinlich die Sekretion nach ebenfalls 48-stündiger Inkubation noch nicht stattgefunden hatte. Die PCR ist zudem sensitiver als ein ELISA.

Bei B-CLL-Zellen wurde eine Erhöhung von TNF α -Sekretion und TNF α -Rezeptoren durch IL-2 nachgewiesen (Larsson et al., 1993, S. 226). Für CpG-ODN ist bekannt, daß sie die TNF α -Sekretion bei normalen PBMCs und B-CLL-Zellen erhöhen (Hartmann et al., 1996, S. 429, Decker et al., 2000, S. 1001). Da TNF α als Wachstumsfaktor auf CLL-Zellen wirkt (Cordingley et al., 1988, S. 969, Van Kooten et al., 1992, S. 1299) ist eine Steigerung der Sekretion jedoch therapeutisch nicht erwünscht.

IL-8, das die Akkumulation von B-CLL-Zellen auf autokrine Weise fördert (Francia di Celle et al., 1996, S. 4382), wurde von B-CLL-Zellen nach allen durchgeführten Stimulationen nur in geringen Konzentrationen sezerniert, bei normalen B-Zellen war die Basissekretion höher, konnte aber durch CpG-ODN und bzw. oder IL-2 nicht weiter erhöht werden. Durch CpG-ODN ist also keine sich nachteilig auswirkende IL-8-vermittelte Akkumulation von CLL-Zellen zu befürchten.

Die Ergebnisse von IL-6-, TNF α - und IL-8-ELISA lassen auch die Aussage zu, daß CpG-ODN nicht einen unspezifischen Effekt auf die Zytokinproduktion haben, sondern die IL-6 und TNF α -Sekretion beispielsweise selektiv erhöhen, die von IL-8 dagegen nicht.

4. Therapeutische Möglichkeiten

Aufgrund der immunmodulatorischen Wirkungen der CpG-ODN liegt ein therapeutischer Einsatz als Vakzinadjuvans, bei allergischen Erkrankungen und in der Immuntherapie von malignen Erkrankungen nahe (Krieg et al., 1999, S. 113).

CpG-DNA induziert stärkere Immunantworten als übliche Adjuvantien bei Impfungen (Weeratna et al., 2000, S. 1755), z. B. konnten HbsAg-Titer und Serokonversionsrate bei Orangutans nach Hepatitis-B-Impfung erhöht werden (Davis et al., 2000, S. 1920).

Bei Asthma bronchiale verhinderte Verabreichung von CpG mit dem Allergen die Induktion von Th2-Immunantwort-vermittelnden Zytokinen, IgE-Produktion und bronchiale Hyperreagibilität (Kline et al., 1998, S. 2555).

Die Antitumor-Aktivität von bakteriellen Extrakten wurde schon vor über 100 Jahren durch W. Coley erkannt. Er konnte durch die lokale Injektion von Streptokokkenlysaten in Sarkome deren vorübergehende Rückbildung erzielen (Wiemann et al., 1994, S. 529). Bei B-CLL ist anzunehmen, daß CpG-ODN-Aktivierung die malignen B-Zellen zu effektiven APCs werden läßt, die MHC I - und MHC II -Moleküle und kostimulatorische Moleküle zusammen mit antigenen Determinanten wie verändertes Oberflächenimmunglobulin (Todd et al., 1997, S. 235) exprimieren und so eine T-Zell-Anergie gegenüber den Tumorzellen überwunden werden kann. Dies wurde auch für Prä-B-ALL-Zellen nach erhöhter B7-1- und B7-2-Expression und CD 40-Aktivierung (Cardoso et al., 1996, S. 41) und auch für B-CLL-Zellen (Buhmann et al., 1999, S. 1992) beschrieben.

CpG-ODN haben sich im Mäuse-Lymphom-Modell sowohl als effektive Immunadjuvantien bei Tumorstoffen (Weiner et al., 1997, S. 10833, Liu et al., 1998, S. 3730) als auch als unterstützend wirksam in der monoklonalen Antikörpertherapie (Woolridge et al., 1997, S. 2994) erwiesen. Bei Mäus melanomen konnte eine Verlangsamung des Wachstums durch Protein-CpG-Vakzinen erzielt werden durch erhöhte Aktivität von zytotoxischen T-Zellen (Davila E. et al., 2000, S. 539). Intraläsionale Injektion von bakterieller DNA in Tumoren konnte deren Regression bewirken (Yamamoto S. et al., 1992, S. 983, Carpentier A. F. et al., 1999, S. 5429).

Die systemische Applikation von CpG-ODN birgt aber auch Gefahren.

Durch die Induktion von Anti-DNA-Antikörpern könnten bei Kreuzreaktivität mit körpereigener DNA Autoimmunkrankheiten wie SLE getriggert werden (Krieg, 1995, S. 284), insbesondere da die aus dem Plasma von SLE-Patienten isolierte DNA reich an CpG-Motiven und wenig methyliert ist, was auf einen bakteriellen Ursprung hindeutet (Krapf et al., 1989, S. 115). Es wurde jedoch gezeigt, daß CpG-DNA weder bei normalen noch bei disponierten Mäusen SLE auslöst und bei letzteren sogar den Krankheitsverlauf mildert (Gilkeson et al., 1996, S. 1389, Mor et al., 1997, S. 293).

Die Balance zwischen Th1- und Th2-Immunantwort wird zugunsten der Th1-Antwort verschoben, was in der Therapie von allergischen Erkrankungen (Van Uden et al., 1999, S. 902) und bei Verwendung als Adjuvans mit Vakzinen (Roman et al., 1997, S. 829) durchaus von Vorteil ist, jedoch z. B. die Abwehr von parasitären Antigenen schwächt. Organspezifische Autoimmunkrankheiten, die durch verstärkte Th1-Antworten gefördert werden, können durch CpG-ODN getriggert werden. So konnte in einem Molekularmimikry-Modell Autoimmunmyokarditis bei simultaner Injektion von CpG-ODN und Chlamydien-Antigen ausgelöst werden (Bachmaier et al., 1999, S. 1335).

Im murinen Modell wurde sogar die Auslösung eines TNF α -vermittelten septischen Schockes beschrieben bei mit D-Galaktosamin für TNF α sensibilisierten Mäusen (Sparwasser et al., 1997, S. 386). Die produzierte TNF α -Menge war dabei von den applizierten DNA-Mengen abhängig. Fraglich ist, ob therapeutisch verabreichte Mengen auch beim Menschen zu septischen Reaktionen führen können. Ein Anstieg der TNF α -Produktion wurde für normale sowie maligne B-Zellen nach CpG-ODN-Stimulation mit Steigerung bei IL-2-Zugabe in dieser Arbeit nachgewiesen.

Bisher wurden Oligonukleotide nur in der Antisense-Therapie von malignen Erkrankungen eingesetzt, wobei als häufigste Nebenwirkung eine reversible Thrombozytopenie bedingt durch das Thioat-Gerüst der ODN auftrat (Cotter F. E., 1999, S. 9).

Mehrere klinische Studien konnten einen Benefit für Patienten mit malignen Erkrankungen durch IL-2-Therapie nachweisen. Sowohl bei fortgeschrittenen Melanomen als auch bei AML (Akute myeloische Leukämie) in der ersten kompletten

Remission zeigte sich eine Verlängerung der Überlebenszeit durch IL-2-Applikation (Keilholz et al., 1998, S. 2921, Chang et al., 2001, S. 88, Cortes et al., 1997, S. 1506).

Als therapeutische Applikationen von CpG-ODN und IL-2 bei B-CLL kommen neben der In-vivo-Gabe noch weitere Varianten in Betracht. Es besteht die Möglichkeit einer Tumor-Vakzine mit B-CLL-Zellen, die in vitro mit CpG-ODN und IL-2 stimuliert wurden. Auch ein adoptiver T-Zell-Transfer von T-Zellen, die mit stimulierten B-CLL-Zellen in vitro inkubiert wurden, wäre möglich. Durch extrakorporale Stimulation mit CpG-ODN und IL-2 können Nebenwirkungen minimiert werden.

Derzeit werden Studien der Phasen 1 und 2 in den USA und Deutschland durchgeführt (Weiner G. J., 2000, S. 455).

Zusammenfassend stellen CpG-ODN eine vielversprechende Substanz dar, die bei CLL mit oder ohne IL-2 therapeutisch eingesetzt werden kann.

VII Zusammenfassung

B-CLL-Zellen sind langlebige Zellen, die aufgrund einer Apoptoseinhibition akkumulieren. Sie führen zu einer unzureichenden Immunantwort, bedingt durch die geringe Dichte an T-Zell-aktivierenden Oberflächenmolekülen. Durch CpG-ODN (bakterielle DNA) und IL-2 können diese Oberflächenmoleküle bei normalen und malignen B-Zellen hochreguliert sowie Proliferation und Sekretion von Immunglobulin und Zytokinen induziert werden. Diese Arbeit untersuchte die Expression der Oberflächenmoleküle CD 25, CD 40, CD 54, CD 58, CD 80, CD 86, MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II, die Produktion der Zytokine IL-6, IL-8 und TNF α sowie die Sekretion von Ig M nach Stimulation mit CpG-ODN oder IL-2 bzw. Kostimulation mit CpG-ODN und IL-2 bei B-CLL-Zellen im Vergleich mit normalen B-Zellen.

Folgende Methoden kamen zum Einsatz: Die Oberflächenmoleküle wurden mittels FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter) bestimmt, Immunglobulin M sowie die Zytokine wurden sowohl mit ELISAs nach dem Sandwichprinzip als auch mit einer RT-PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Zudem wurden Proliferationsassays durchgeführt.

Bei den bestimmten Oberflächenmolekülen konnte für B-CLL-Zellen nach alleiniger IL-2-Stimulation kein Effekt nachgewiesen werden. Das CpG-ODN DSP 30 führte zur vermehrten Expression aller untersuchten Oberflächenmoleküle. Durch Kostimulation mit IL-2 und DSP 30 konnte bei allen Oberflächenmolekülen außer CD 58 zusätzlich zur Stimulation mit DSP 30 eine weitere Hochregulierung erreicht werden.

Die gegenüber normalen B-Zellen reduzierte Proliferationsrate nach DSP 30-Stimulation konnte durch Kostimulation mit IL-2 und DSP 30 bei B-CLL-Zellen auf dieselbe Höhe gebracht werden wie bei normalen B-CLL-Zellen.

Sowohl für die Sekretion von Ig M als auch von TNF α und IL-6 wurde im ELISA eine Steigerung bei Kostimulation mit DSP 30 und IL-2 gegenüber der alleinigen DSP 30-Stimulation gezeigt. IL-2 alleine führte zu keiner Zunahme der Sekretion. Die Ergebnisse konnten qualitativ in der RT-PCR reproduziert werden. IL-8-Produktion war nicht induzierbar.

Diese Resultate deuten auf eine verbesserte APC-Funktion von B-CLL-Zellen nach CpG-ODN- und IL-2-Stimulation durch vermehrte Expression von kostimulatorischen Molekülen zusammen mit MHC-Klasse- I- oder MHC-Klasse- II-Molekülen und antigenen Determinanten wie z. B. verändertes Oberflächenimmunoglobulin hin und legen einen therapeutischen Einsatz in vivo oder in vitro nahe.

VIII Literaturverzeichnis

Abbas A., Lichtman A., Pober J., B cell activation and antibody production, In: „Cellular and Molecular Immunology“, Saunders Company, Philadelphia, 1997, third edition, 196 – 212

Abbas A., Lichtman A., Pober J., T lymphocyte antigen recognition and activation, In: „Cellular and Molecular Immunology“, Saunders Company, Philadelphia, 1997, third edition, 138 - 170

Aderka D., Maor Y., Novick D., Engelmann H., Kahn Y., Levo Y., Wallach D., Revel M., Interleukin-6 inhibits the proliferation of B-chronic lymphocytic leukemia cells that is induced by tumor necrosis factor- α or - β ; Blood 81, 1993 2076 – 2084

Bachmaier K., Meu M., Maza L. M., Pal S., Nessel A., Penninger J. M., Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry, Science 283, 1999, 1335 – 1339

Banchereau J., Rousset F., Growing human B lymphocytes in the CD 40 system, Nature 353, 1991, 678 - 679

Banchereau J., Rousset F., Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation, Adv. Immunol. 52, 1992, 125 - 262

Bandini G., Michallet M., Rosti G., Tura S., Bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia, Bone Marrow Transplant 7, 1991, 251 - 253

Bauer M., Heeg K., Wagner H., Lipford G. B., DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner, Immunology 97, 1999, 699 – 705

Begley G. C., Burton J. D., Tsudo M., Brownstein B. H., Ambrus J. L., Waldmann T. A., Human B lymphocytes express the p75 component of the Interleukin-2 receptor, *Leukemia Research* 14, 1990, 263 – 271

Bich-Thuy L. T., Fauci A. S., Direct effect of interleukin 2 on the differentiation of human B cells which have not been preactivated in vitro, *Eur. J. Immunol.* 15, 1985, 1075 – 1082

Binet J., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Piguet H., Goasguen J., Vaugier G., Potron G., Colona P., Oberling F., Thomas M., Tchernia G., Jacquillat C., Boivin P., Lesty C., Dunault M. T., Monconduit M., Belabbes S., Gremy F., A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis, *Cancer* 48, 1981, 198 -206

Bird A. P., Functions for DNA methylation in vertebrates, *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology* 53, 1993, 281 - 285

Boussiotis V. A., Nadler L. M., Strominger J. L., Goldfeld A. E., Tumor necrosis factor α is an autocrine growth factor for normal human B cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 1994, 7007 – 7011

Branda R. F., Moore A. L., Lafayette A. R., Mathews L., Hong R., Zon G., Brown T., McCormack J. J., Amplification of antibody production by phosphorothioate oligodesoxynucleotides, *J. Lab. Clin. Med.* 128, 1996, 329 - 338

Buhmann R., Nolte A., Westhaus D., Emmerich B., Hallek M., CD 40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor-immunotherapy: stimulation of allogenic versus autologous T cells generates different types of effector cells, *Blood* 93, 1999, 1992 - 2002

Buschle M., Campana D., Carding S. R., Richard C., Hoffbrand A. V., Brenner M. K., Interferon γ inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia, *J. Exp. Med.* 177, 1993, 213 – 218

Caligaris-Cappio F., B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti-self B-cells, *Blood* 87, 1996, 2615 – 2620

Caligaris-Cappio F., B-lymphoproliferation and normal B-cell-differentiation, In: „B Cell Ontogeny and B Cell Subset“, Bird G., Calvert J. E. (Eds.), Oxford, 323 – 335

Caligaris-Cappio F., Bergui L., Tesio L., Corbascio G., Tuosco F., Marchisio P. C., Cytoskeleton organization is aberrantly rearranged in the cells of B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia, *Blood* 67, 1986, 233 – 239

Caligaris-Cappio F., Hamblin T. J., B-cell chronic lymphocytic leukemia: A bird of a different feather, *J. Clin. Oncol.* 17, 1999, 399 – 408

Cardoso A. A., Schultze J. L., Boussiotis V. A., Freeman G. J., Seamon M. J., Laszlo A., Billet A., Sallan S. E., Gribben J. G., Nadler L. M., Pre-B acute lymphoblastic leukemia cells may induce T-cell anergy to alloantigen, *Blood* 88, 1996, 41 – 48

Carpentier A. F., Chen L., Maltoni F., Delattre J.-Y., Oligodesoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of neuroblastoma in mice, *Cancer Research* 59, 1999, 5429 – 5432

Chang E., Rosenberg S. A., Patients with melanoma metastases at cutaneous and subcutaneous sites are highly susceptible to interleukin-2-based therapy, *J. Immunother.* 24, 2001, 88 – 90

Chaouchi N., Wallon C., Goujard C., Tertian G., Rudent A., Caput A., Ferrera P., Minty A., Vazquez A., Delfraissy J. F., Interleukin-13 inhibits interleukin-2 induced proliferation and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from in vitro apoptosis, *Blood* 87, 1996, 1022 – 1029

Chaperot L., Plumas J., Jacob M. C., Bost F., Molens J. P., Sotto J. J., Bensa J. C., Functional expression of CD 80 and CD 86 allows immunogenicity of malignant B cells from non-Hodgkin's lymphomas, *Exp. Hematol.* 27, 1999, 479 - 488

Chromczynski P., Sacchi N., Single step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanat-Phenol-Chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162, 156-159

Clark E. A., Ledbetter J. A., How B and T cells talk to each other, *Nature* 367, 1994, 425 – 428

Collins R. J., Verschuer L. A., Harmon B. V., Prentice R. L., Pope J. H., Kerr J. F. R., Spontaneous programmed deaths (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro , *Br. J. Hematol* 71, 1989, 343- 350

Cordingley F. T., Hoffbrand A. V., Heslop H. E., Turner M., Bianchi A., Reittie J. E., Vyakarnam A., Meager A., Tumor necrosis factor as an autocrine tumor growth factor for chronic B-cell malignancies, *Lancet* 1, 1988, 969 – 971

Cortes J. E., Kantarjian H. M., O'Brien S., Giles F., Keating M. J., Freireich E. J., Estey E. H., A pilot study of interleukin-2 for adult patients with acute myelogenous leukemia in first complete remission, *Cancer* 85, 1999, 1506 – 1513

Cotter F. E., Antisense therapy of hematologic malignancies, *Semin. Hematol.* 36, 1999, 9 – 14

Crawley J. B., Rawlinson S., Lali F. V., Page T. H., Saklatvala J., Foxwell B. M., T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation, *J. Biol. Chem.* 272, 1997, 15023 – 15027

Danescu M., Rubio-Trujillo M., Biron G., Bron D., Delspesse G., Sarfati M., Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression, *J. Exp. Med.* 176, 1992, 1319 – 1326

Davila E., Celis E., Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity, *J. Immunol.* 65, 2000, 539 – 547

Davis H. L., Suparto I., Weeratna R., Juminarto, Iskandriati D., Chamzah S., Maruf A., Nente C., Pawitri D., Krieg A. M., Heriyanto, Smits W., Sajuthi D., CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans, *Vaccine* 18, 2000, 1920 – 1924

Dazzi F., D'Andrea E., Biasi G., De Silvestro G., Gaidano G., Schena M., Tison T., Vianello F., Girolami A., Caligaris-Cappio F., Failure of B cells of chronic lymphocytic leukemia in presenting soluble and alloantigens, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 75, 1995, 26 – 32

Decker T., Schneller F., Kronschnabl M., Dechow T., Lipford G. B., Wagner H., Peschel C., Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype, *Exp. Hematol.*, 2000, 558 – 568

Decker T., Schneller F., Sparwaser T., Tretter T., Lipford G. B., Wagner H., Peschel C., Immunostimulatory CpG-oligonucleotids cause proliferation, cytokine production and an immunogenic phenotype in B-CLL-patients, *Blood* 95, 2000, 999 - 1006

Deeths M. J., Mescher M. F., ICAM-1 and B7-1 provide similar but distinct costimulation for CD8⁺ T cells, while CD4⁺ T cells are poorly costimulated by ICAM-1, *Eur. J. Immunol.* 29, 1999, 45 – 53

Douglas R. S., Capocasale R. J., Lamb R. J., Novell P. C., Moore J. S., Chronic lymphocytic leukemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor-beta, *Blood* 89, 1997, 941 - 947

Ebbe S., Wittels B., Dameshek W., Autoimmune thrombocytopenic purpura (ITP type) with chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 19, 1962, 23 - 27

Fernandez L. A., Macsween J. M., Langley G. R., Immunoglobulin secretory function of B cells from untreated patients with chronic lymphocytic leukemia and hypogammaglobulinemia: role of T cells, *Blood* 62, 1983, 767 - 774

Fields P. E., Finch R. J., Gray G. S., Zollner R., Thomas J. L., Sturmhoefel K., Lee K., Wolf S., Gajewski T. F., Fitch F. W., B7.1 is a quantitatively stronger stimulus in the activation of naive CD8⁺ TCR transgenic mice, *J. Immunol.* 161, 1998, 5268 - 5275

Foa R., Massaia M., Cardona S., Tos A. G., Bianchi A., Attisano C., Guarini A., Di Celle P. F., Fierro T., Production of Tumor Necrosis Factor-alpha by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: A possible regulatory role of TNF in the progression of the disease, *Blood* 76, 1990, 393 – 400

Foon A. K., Gale P. R., Chronic Lymphoid Leukemias, In: „Blood: Principles and Practice of Hematology“, Hanadin R. I., Lux S. E., Stossel T. P. (Eds), J. B. Lippin Company, Philadelphia, 1995, third edition, 783 – 809

Fluckiger A. C., Garrone P., Durand I., Galizzi J. P., Banchereau J., Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes, *J. Exp. Med.* 178, 1993, 1473 – 1481

Fluckiger A. C., Rossi J. F., Bussel A., Byron P., Banchereau J., Defrance T., Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia cells activated via surface Igs or CD 40 to B-cell tropic factors, *Blood* 80, 1992, 3173 – 3181

Francia di Celle P., Mariani S., Riera L., Stachini A., Reato G., Foa R., Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion, *Blood* 87, 1996, 4382 - 4389

Frank D. A., Mahajan S., Ritz J., B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT 3 constitutively phosphorylated on serine residues, *J. Clin. Invest.* 100, 1997, 3140 – 3148

French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia, Effects of chlorambucil and therapeutic decision in initial forms of chronic lymphocytic leukemia (stage A): results of a randomized clinical trial on 612 patients, *Blood* 75, 1990, 1414 - 1421

Gilkeson G. S., Ruiz P., Phippen A. M. M., Alexander A. L., Lefkowitz J. B., Pisetsky D. S., Modulation of renal disease in autoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA, *J. Exp. Med.* 183, 1996, 1389 - 1397

Gonzalez-Garcia A., Merida I., Martinez A. C., Carrera A. C., Intermediate affinity Interleukin-2 receptor mediates survival via a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway, *J. Biol. Chem.* 272, 1997, 10220 - 10226

Häcker H., Signal transduction pathways activated by CpG-DNA, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 247, 2000, 77 - 92

Häcker H., Mischak H., Häcker G., Eser S., Prenzel N., Ullrich A., Wagner H., Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases by CpG-DNA controls interleukin-12 release from antigen-presenting cells, *EMBO* 18, 1999, 6973 - 6982

Häcker H., Mischak H., Miethke T., Liptay S., Schmid R., Sparwasser T., Heeg K., Lipford G. B., 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* 17, 1998 , 101 – 110

Halpern M. D., Kurlander R. J., Pisetsky D. S., Bacterial DNA induces murine interferon gamma production by stimulation of IL-12 and tumor necrosis factor, *Cell. Immunol.* 167, 1996, 72 - 78

Hartmann G., Krieg A. M., Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells, *J. Immunol.* 164, 2000, 944 – 952

Hartmann G., Krug A., Waller-Fontaine K., Endres S., Oligodesoxynucleotides enhance lipopolysaccharide stimulated synthesis of tumor necrosis factor: dependence on phosphorothioate modification and reversal by heparin, *Mol. Med.* 2, 1996, 429 – 438

Hartmann G., Weeratna R. D., Ballas Z. K., Payette P., Blackwell S., Suparto I., Rasmussen W. L., Waldschmidt M., Sajuthi D., Purcell R. H., Davis H. L., Krieg A. M., Delineation of a CpG phosphorothioate oligodesoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo, *J. Immunol.* 164, 2000, 1617 – 1624

Hathcock K. S., Hodes R. J., Role of the CD28-B7 costimulatory pathways in T cell-dependent B cell responses, *Adv. Immunol.* 62, 1996, 131 - 166

Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira A., A toll like receptor recognizes bacterial DNA, *Nature*, 2000, 740 – 745

Hivroz C., Grillot-Courvalin C., Brouet J. C., Seligmann M., Heterogeneity of responsiveness of chronic lymphocytic leukemic B cells to B cell growth factor or interleukin 2, *Eur. J. Immunol.* 16, 1986, 1001 - 1004

Hulkkonen J., Vilpo J., Vilpo L., Hurme M., Diminished production of interleukin-6 in chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) cells from patients at advanced stages of disease, *Br. J. Hematol.* 100, 1998, 478 – 483

Johnson T. A., Rassenti L. Z., Kipps T. J., Ig V_H 1 genes expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia exhibit distinctive molecular features, *J. Immunol.* 158, 1997, 235 – 246

Johnston J. A., Kawamura M., Kirken R. A., Chen Y.-Q., Blake T. B., Shibuya K., Ortaldo J. R., McVicar D. W., O'Shea J. J., Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2, *Nature* 370, 1994, 151 – 153

Karray S., DeFrance T., Merle-Beral H., Banchereau J., Debre P., Galanaud P., Interleukin 4 counteracts the interleukin 2-induced proliferation of monoclonal B cells, *J. Exp. Med.* 168, 1988, 85 - 94

Karray S., Merle-Beral H., Vazquez A., Gerard J. P., Galanaud P., Functional heterogeneity of B-CLL lymphocytes: dissociated responsiveness to growth factors and distinct requirements for a first activation signal, *Blood* 70, 1987, 1105 - 1110

Kay N. E., Abnormal T-cell subpopulation function in CLL: excessive suppressor (T) and deficient helper (T) activity with respect to B-cell proliferation, *Blood* 57, 1981, 418 - 420

Keating M. J., Walters R. S., Kantarjian H., Talpaz M., Andersson B., Beran M., McCredie K. B., Freireich E. J., Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 74, 1989, 19 - 27

Keilholz U., Conradt C., Legha S. S., Khayat D., Scheibenbogen C., Thatcher N., Goey S. H., Gore M., Dorval T., Hancock B., Punt C. J. A., Dummer R., Avril M.-F., Bröcker E. B., Benhammouda A., Eggermont A. M. M., Pritsch M., Results of interleukin-2-based treatment in advanced melanoma: a case-based analysis of 631 patients, *J. Clin. Oncol.* 9, 1998, 2921 – 2929

Kipps T. J., Carson D. A., Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune diseases, *Blood* 81, 1993, 2475 – 2487

Kline J. N., Waldschmidt T. J., Businga T. R., Lemish J. E., Weinstock J. V., Thorne P. S., Krieg A. M., Modulation of airway inflammation by CpG Oligodesoxynucleotides in a murine model of asthma, *J. Immunol.* 60, 1998, 2555 - 2559

Klinman D. M., Yi A.-K., Beaucage S. L., Conover J., Krieg A. M., CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon γ , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1996, 2879 – 2883

Kneitz C., Goller M., Wilhelm M., Mehringer C., Wohlleben G., Schimpl A., Tony H. P., Inhibition of T cell / B cell interaction by B-CLL cells, *Leukemia* 13, 1999, 98 – 104

Kondo M., Ohashi Y., Tada K., Nakamura M., Sugamura K., Expression of the mouse interleukin-2 receptor gamma chain in various cell populations of the thymus and spleen, *Eur. J. Immunol.* 24, 1994, 2026 – 2030

Kondo M., Takeshita T., Higuchi M., Nakamura M., Sudo T., Nishikawa S., Sugamura K., Functional participation of the IL-2 Receptor γ chain in IL-7 receptor complexes, *Science* 263, 1994 , 1453 – 1454

Krapf F. E., Hermann M., Leitmann W., Kalden J. R., Are retroviruses involved in the pathogenesis of SLE? Evidence demonstrated by molecular analysis of nucleic acids from SLE patients' plasma, *Rheumatol. Int.*, 9, 1989, 115 - 121

Krieg A. M., CpG DNA, a pathogenetic factor in systemic lupus erythematosus, *J. Clin. Invest.* 15, 1995, 284 – 292

Krieg A. M., Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA, *Trends Microbiol.* 4, 1996, 73 – 77

Krieg A. M., Yi A. K., Hartmann G., Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory CpG DNA, *Pharmacol. Ther.* 84, 1999, 113 – 120

Krieg A. M., Yi A. K., Matson S., Waldschmidt T. J., Bishop G. A., Teasdale R., Koretzky G. A., Klinman D. M., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation, *Nature* 374, 1995, 546 – 549

Lagneaux L., Delforge A., Bron D., De Bruyn C., Stryckmans P., Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells, *Blood* 91, 1998, 2387 – 2396

Lankester A. C., Van Schijndel G. M. W., Van der Schoot C. E., Van Oers M. H. J., Van Noessel C. J. M., Van Lier R. A. W., Antigen receptor nonresponsiveness in chronic lymphocytic leukemia B cells, *Blood* 86, 1995, 1090 – 1097

Larson R. S., Springer T. A., Structure and function of leukocyte integrins, *Immunol. Rev.* 114, 1990, S. 181 - 217

Larsson L. G., Carlsson M., Schena M., Lantz M., Caligaris-Capio F., Nilsson K., Interleukin-2 enhances the production of tumor necrosis factor-alpha in activated B-type chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells, *Leukemia* 7, 1993, 226 – 234

Laytragoon-Lewin N., Duhony E., Bai X.-F., Mellstedt H., Downregulation of the CD 95 receptor and defect CD 40-mediated signal transduction in B-chronic lymphocytic leukemia cells, *Eur. J. Haematol.* 61, 1998, 266 - 271

Lenschow D. J., Walunas T. L., Bluestone J. A., CD28/B7 system of T cell costimulation, *Annu. Rev. Immunol.* 14, 1996, 233 – 258

Li M., Yang J., Zhang H., Shao J. F., Su N., Liu S. P., Enhancement of B cell responses by the interaction of CD 2 with LFA-3, *J. Tongji. Med. Univ.* 12, 1992, 71 - 74

Liang H., Nishioka Y., Reich C. F., Pisetsky D. S., Lipsky P. E., Activation of human B cells by phosphorothioate oligodesoxynucleotids, *J. Clin. Invest.* 98, 1119 – 1129

Lipford G. B., Heeg K., Wagner H., Bacterial DNA as immune cell activator; *Trends Mikrobiol.* 6, 1998, 496 – 500

Liu H.-M., Newsbrough S. E., Bhatia S. K., Dahle C. E., Krieg A. M., Weiner G. J., Immunostimulatory CpG Oligodesoxynucleotides enhance the immune response to vaccine strategies involving granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor, *Blood* 92, 1998, 3730 – 3736

Löffler G., Replikation und Genetik, In: „Biochemie und Pathobiochemie“, Löffler G., Petrides P. E. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 1998, Sechste Auflage, 205 – 237

Makgoba M. W., Sanders M. E., Ginther Luce L., Gugel E. A., Dustin M. L., Springer T. A., Shaw S., Functional evidence that intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for LFA-1-dependent adhesion in T cell mediated cytotoxicity, *Eur. J. Immunol* 18, 1988, 637 - 640

Mainou-Fowler T., Coplestone J. A., Prentice A. G., Effect of interleukins on the proliferation and survival of B cell chronic lymphocytic leukemia cells, *J. Clin. Pathol.* 48, 1995, 482 – 487

Mainou-Fowler T., Craig V. A., Coplestone J. A., Hamon M. D., Prentice A. G., Interleukin-5 (IL-5) increases spontaneous apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro independently of bcl-2 expression and is inhibited by IL-4, *Blood* 84, 1994, 2297 – 2304

Martin-Orozco E., Kobayashi H., Van Uden J. M., Nguyen M. D., Kornbluth R. S., Raz E., Enhancement of antigen-presenting cell surface molecules involved in cognate interaction by immunostimulatory DNA sequences, *Int. Immunol.* 11, 1999, 1111 - 1118

Meinhardt G., Wendtner C., Hallek M., Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia, factors and signalling pathways regulating cell growth and survival, *J. Mol. Med.* 77, 1999, 282 – 293

Montserrat E., Esteve J., Schmitz N., Dreger P., Meloni G., Catovsky D., Dearden C., Scime R., Sutton L., Kimby E., Desablens B., Pavletic S., Coiffier B., Juliusson G., Besalduch J., Del Potro E., Michallet M., Autologous stem-cell transplantation (ASCT) for chronic lymphocytic leukemia (CLL): results in 107 patients, *Blood* 94, suppl., 1999, 397a

Mor G., Singla M., Steinberg A. D., Hoffman S. L., Okuda K., Klinman D. M., Do DNA vaccines induce autoimmune disease?, *Hum. Gene Ther.* 8, 1997, 293 – 300

Mueller D. L., Jenkins M. K., Schwartz R. H., Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy, *Annu. Rev. Immunol.* 7, 1989, 445 - 480

Mutis T., Schrama E., Melief C. J., Goulmy E., CD 80-transfected acute myeloid leukemia cells induce primary allogenic T-cell responses directed at patients specific minor histocompatibility antigens and leukemia-associated antigens, *Blood* 95, 1998, 1677 - 1684

Nakajima A., Watanabe N., Yoshino S., Yagita H., Okumura K., Azuma M., Requirement of CD 28 - CD 86 co-stimulation in the interaction between antigen-primed T helper type 2 and B cells, *Int. Immunol.* 9, 1997, 637 - 644

Nakanishi K., Malek T. R., Smith K. A., Hamaoka T., Shevach E. M., Paul W. E., Both interleukin 2 and second T cell-derived factor in EL-4 supernatant have activity as differentiation factor in IgM synthesis, *J. Exp. Med.* 160, 1984, 1605 - 1621

Nelson B. H., Willerford D. M., *Biology of the interleukin-2 receptor*, *Adv. Immunol.* 70, 1998, 1 – 81

Nilsson K., The control of growth and differentiation in chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells, In: „Chronic Lymphocytic Leukemia: Scientific Advances & Clinical Development“, Cheson B. D. (Ed), Marcel Dekker Inc, New York, NY, 1992, 33 – 45

Nishioka Y., Lipsky P. E., The role of CD40-CD40 ligand interaction in human T cell – B cell collaboration, *J. Immunol.* 153, 1994, 1027 – 1036

Noelle R. J., Snow E. C., Cognate interactions between helper T cells and B cells, *Immunol. Today* 149, 1996, 361 - 367

O'Brien S., Del Giglio A., Keating M., Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 85, 1995, 307 – 318

O'Brien S. M., Thomas D. A., Freireich E. J., Andreeff M., Giles F. J., Keating M. J., Rituxan has significant activity in patients with CLL, *Blood* 94 suppl., 1999, 603a

Panayiotis P., Ganeshaguru K., Jabbar S. A. B., Hoffbrand A. V., Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in B-chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro, *Br. J. Haematol.* 85, 1993, 439 – 445

Pisetsky D. S., Immunostimulatory DNA: A clear and present danger?, *Nature Medicine* 3, 1997, 829 - 831

Plumas J., Chaperot L., Jacob M.-C., Molens J.-P., Giroux C., Sotto J.-J., Bensa J.-C., Malignant B lymphocytes from non-Hodgkin's lymphoma induce allogenic

proliferative and cytotoxic T cell responses in primary mixed lymphocyte cultures: an important role of costimulatory molecules CD 80 (B7-1) and CD 86 (B7-2) in stimulation by tumor cells, *Eur. J. Immunol.* 25, 1995, 3332 - 3341

Rai K. R., Patel D.V., Chronic Lymphocytic Leukemia, In: „Hematology, Basic Principles and Practice“, Hoffman R., Benz E.J., Shattil S. J., Furie B., Cohen H. J. (Eds), Churchill Livingstone, New York, 1993, 1308 – 13191

Rai K. R., Sawitsky A., Cronkite E.P., Chanana A. D., Levy R. N., Pasternak B. S., Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 46, 1975, 219 - 234

Ranheim E. A., Kipps T. J., Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40 - dependent signal, *J. Exp. Med.* 177, 1993, 925 – 935

Reed J. C., Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia, *Sem. Oncol.* 25, 1998, 11 – 18

Reittie J., Yong K., Panayiotidis P., Hoffbrand A., Interleukin-6 inhibits apoptosis and tumor necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia and Lymphoma* 22, 1996, 82 – 90

Roman M., Martin-Orozco E., Goodman J. S., Nguyen M. D., Sato Y., Ronaghy A., Kornbluth R. S., Richman D. D., Carson D. A., Raz E., Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants, *Nat. Med.* 3, 1997, 829 – 854

Robertson M. J., Manley U. J., Pichert G. Cameron C., Cochran K. J., Levine H., Ritz J., Functional consequences of APO-1 Fas (CD 95) antigen expression by normal and neoplastic hematopoietic cells, *Leuk. Lymphoma* 17, 1995, 51 - 61

Schultze J. L., Seamon M. J., Michalak S., Gribben J. G., Nadler L. M., Autologous tumor infiltrating T cells cytotoxic for follicular lymphoma cells can be expanded in vitro, *Blood* 89, 1997, 3806 - 3816

Sparwasser T., Koch E. S., Vabulas R. M., Heeg K., Lipford G. L., Ellwart J. W., Wagner H., Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotids trigger maturation and activation of murine dendritic cells, *Eur. J. Immunol.* 28, 1998, 2045 – 2054

Sparwasser T., Miethke T., Lipford G., Borschert K., Häcker H., Heeg K., Wagner H., Bacterial DNA causes septic shock, *Nature* 386, 1997, 336

Sparwasser T., Miethke T., Lipford G., Erdmann A., Häcker H., Heeg K., Wagner H., Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α -mediated shock, *Eur. J. Immunol.* 27, 1997, 1671 – 1679

Stamenkovic I., Clark E. A., Seed B., A B-lymphocyte activation molecule is related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas, *EMBO J.* 8., 1989, 1403 - 1410

Stremmel C., Greenfield E. A., Howard E., Freeman G. J., Kuchroo V. K., B7-2 expressed on EL4 lymphoma suppresses antitumor immunity by an interleukin-4 dependent mechanism, *J. Exp. Med.* 189, 1999, 919 – 930

Takehita T., Ohtani K., Asao H., Satoru K., Nakamura M., Sugamura K., An associated molecule, p64, with IL-2 receptor β chain, *J. Immunol.* 148, 1992, 2154 – 2158

Todd A. J., Rassenti L. Z., Kipps T. J., Ig V_H1 genes expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia exhibit distinctive molecular features, *J. Immunol.* 158, 1997, 235 – 246

Tokunaga T., Yamamoto H., Shimada S., Abe H., Fukuda T., Fujisawa Y., Turntani Y., Yano O., Antitumor activity of desoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. Isolation, physicochemical characterization and antitumor activity, *J. Natl. Cancer inst.* 72, 1984, 955 - 962

Touw I., Dorssers L., Löwenberg B., The proliferative response of B cell chronic lymphocytic leukemic B cells to interleukin 2: functional characterization of the interleukin 2 membrane receptors, *Blood* 69, 1987, 1667 - 1676

Trentin L., Zambello R., Agostini C., Enthammer C., Cerutti A., Adami F., Zamboni S., Semenzato G., Expression and regulation of tumor necrosis factor, interleukin-2, and hematopoietic growth factor receptors in B-cell chronic lymphocytic leukemia , *Blood* 84, 1994, 4249 - 4256

Tretter T., Schuler M., Schneller F., Brass U., Esswein M., Aman M. J., Huber C., Peschel C., Direct cellular interaction with activated CD 4+ T cells overcomes hyporesponsiveness of B-Cell chronic lymphocytic leukemia, *Cell. Immunol.* 189, 1998, 41 – 50

Tsuda M., Uchiyama T., Uchino H., Expression of Tac antigen on activated normal human B cells, *J. Exp. Med.* 160, 1984, 612 - 617

Unanue E. R., Cellular studies of antigen presentation by class II MHC molecules, *Curr. Opin. Immunol.* 4, 1992, 63 - 69

Van den Hove L. E., Van Gool S. W., Vandenberghe P., Bakkus M., Thielemans K., Boogaerts M. A., Ceuppens J. L., CD 40 triggering of chronic lymphocytic leukemia B cells results in efficient alloantigen presentation and cytotoxic T lymphocyte induction by up-regulation of CD 80 and CD 86 costimulatory molecules, *Leukemia* 11, 1997, 572 – 580

Van der Weil-van den Kemenade E., Te Velde A. A., De Boer A. J., Weening R. S., Fischer A., Borst J., Melief C. J., Figdor C. G., Both LFA-1-positive and – deficient T cell clones require the CD2/LFA-3 interaction for specific cytolytic activation, *Eur. J. Immunol.* 22, 1992, 1467 - 1475

Van Kooten C., Rensink I., Aarden L., van Oers R., Interleukin-4 inhibits both paracrine and autocrine tumor necrosis factor-alpha-induced proliferation of B chronic lymphocytic leukemia cells, *Blood* 80, 1992, 1299 – 1306

Van Kooten C., Rensink I., Aarden L., van Oers R., Effect of IL-4 and IL-6 on the proliferation and differentiation of B-chronic lymphocytic leukemia cells, *Leukemia* 7, 1993, 618 – 624

Van Kooten A., Banchereau J., CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair, *Adv. Immunol.* 61, 1996, 1 -77

Van Parijs L., Sethna M. P., Schweitzer A. N., Borriello F., Sharpe A. H., Abbas A. K., Functional consequences of dysregulated B7-1 (CD80) and B7-2 (CD 86) expression in B or T lymphocytes of transgenic mice, *J. Immunol.* 159, 1997, 5336 - 5344

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

Van Uden J., Raz E., Immunostimulatory DNA and applications to allergic disease, *J. Allerg. Clin. Immunol.* 104, 1999, 902 - 910

Wagner H., Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger, *Adv. Immunol.* 73, 1999, 329 – 368

Waldmann T. A., The structure, function and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes, *Science* 232, 1986, 727 - 732

Wang D., Freeman G. J., Levine H., Ritz J., Robertson M. J., Role of the CD 40 and CD 95 (APO-1/Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies, *Br. J. Hematol.* 97, 1997, 409 – 417

Wang Z., Karras J. G., Colarusso T. P., Foote L. C., Rothstein T. L., Unmethylated CpG motifs protect murine B lymphocytes against Fas-mediated apoptosis, *Cell. Immunol.* 180, 1997, 162 – 167

Weeratna R. D., McCluskie M. J., Xu Y., Davis H. L., CpG DNA induces stronger responses with less toxicity than other adjuvants, *Vaccine* 18, 2000, 1755 – 1762

Weiner G. J., The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodesoxynucleotides, *J. Leukoc. Biol.* 68, 2000, 455 – 463

Weiner G. J., Liu H.-M., Woolridge J. E., Dahle C. E., Krieg A. M., Immunostimulatory oligodesoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 1997, 10833 – 10837

Wen Z., Zhong Z., Darnell J. E., Maximal Activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation, *Cell* 82, 1995, 241 - 250

Wiemann B., Starnes C. O., Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective, *Pharmacol. Ther.* 64, 1994, 529 - 564

Woolridge J. E., Ballas Z., Krieg A. M., Weiner G. J., Immunostimulatory oligodesoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficiency of monoclonal antibody therapy of lymphoma, *Blood* 89, 1997, 2994 - 2998

Yamamoto S., Yamamoto T., Shimada S., Kuramoto E., Yano O., Kataoka T., Tokunaga T., DNA from bacteria, but not from vertebrates induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth, *Microbiol. Immunol.*, 1992 36, 983 - 997

Yamamoto T., Yamamoto S., Kataoka T., Tokunaga T., Ability of oligonucleotides with certain palindromic sequences to induce interferon production and augment natural killer cell activity is associated with their base length, *Antisense Res. Dev.* 4, 1994, 119 - 122

Yellin M. J., Sinning J., Covey L. R., Sherman W., Lee J. J., Glickman-Nir E., Sippel K. C., Rogers J., Cleary A. M., Parker M., Chess L., Lederman S., T lymphocyte T cell-B cell-activating molecule/CD40-L molecules induce normal B cells or chronic lymphocytic leukemia cells to express CD80 (B7/BB-1) and enhance their costimulatory activity, *J. Immunol.* 153, 1994, 666 – 674

Yi A.-K., Chang M., Peckham D. W., Krieg A. M., Ashman R. F., CpG oligodesoxyribonucleotids rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry, *J. Immunol.* 160, 1998, 5898 – 5906

Yi A.-K., Klinman D. M., Martin T. S., Matson S., Krieg A. M., Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA, *J. Immunol.* 157 , 1996, 5394 – 5402

Yi A.-K., Krieg A. M.; Cutting Edge: Rapid induction of mitogen-activated protein kinases by immune stimulatory CpG DNA, *J. Immunol.* 161, 1998, 4493 – 4497

York I. A., Rock K. L., Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex, *Ann. Rev. Immunol.* 14, 1996, 369 - 396

Yuschenkoff V. N., Sethna M. P., Freeman G. J., Parker D. C., Coexpression of B7-1 and antigen blocks tolerance induction to antigen presented by resting B cells, *J. Immunol.* 157, 1996, 1987 - 1985