

# **Differenzierung zweier Klassen von CpG-Oligonukleotiden anhand ihrer Struktur und ihrer Wirkung auf plasmazytoide dendritische Zellen**

vorgelegt von  
Miren Kerkmann  
aus Dinslaken  
2004

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie  
Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt  
Klinikum der Universität  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

**Differenzierung zweier Klassen von CpG-Oligonukleotiden anhand ihrer  
Struktur und ihrer Wirkung auf plasmazytoide dendritische Zellen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Miren Kerkmann  
aus Dinslaken  
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. P. B. Becker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. S. Bohlander  
Prof. Dr. med. J. Johnson

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. med. G. Hartmann

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

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2004

# Inhaltsverzeichnis

## **1 EINLEITUNG**

1.1	Fragestellung .....	3
1.2	Die plasmazytoide dendritische Zelle.....	4
1.2.1	Immunologische Charakterisierung und Entdeckung.....	4
1.2.2	Vorkommen und Funktion .....	5
1.2.3	Pathophysiologische Bedeutung.....	7
1.3	Typ I Interferon .....	8
1.3.1	Produktion von Typ I Interferon.....	9
1.3.2	Wirkung von Typ I Interferon .....	11
1.3.3	Therapeutische Anwendung und Pathophysiologie .....	11
1.4	CpG-Oligonukleotide .....	12
1.4.1	Definition und geschichtlicher Hintergrund.....	12
1.4.2	Wirkung auf das Immunsystem.....	13
1.4.3	Wirkungsmechanismus.....	16
1.4.4	Therapeutische Strategien .....	18
1.5	Nanopartikel .....	20
1.5.1	Definition und geschichtlicher Hintergrund.....	20
1.5.2	Anwendung von Nanopartikeln.....	22
1.5.3	Nanopartikel als Trägersysteme für Nukleinsäuren .....	24

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

2.1	Verwendete Oligonukleotide.....	27
2.2	Strukturanalyse von CpG-Oligonukleotiden .....	28
2.2.1	Gelelektrophorese.....	28
2.2.2	Rasterkraftmikroskopie .....	31
2.3	Isolation und Kultur plasmazytoider dendritischer Zellen .....	34
2.3.1	Isolation plasmazytoider dendritischer Zellen.....	34
2.3.2	Kultur plasmazytoider dendritischer Zellen .....	36
2.3.3	Durchflusszytometrie.....	36
2.3.4	Quantifizierung der Zytokinsekretion .....	37
2.3.5	Versuche mit Antikörpern .....	38
2.3.6	Statistische Analyse.....	39

2.4	Versuche mit CpG-Oligonukleotid-beladenen Nanopartikeln .....	39
2.4.1	Herstellung von CpG-Oligonukleotid-beladenen Nanopartikeln .....	39
2.4.2	Zellkultur mit CpG-Oligonukleotid-beladenen Nanopartikeln .....	43
2.4.3	Aufnahme durch plasmazytoide dendritische Zellen .....	43
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	
3.1	Strukturanalyse von CpG-Oligonukleotiden .....	44
3.1.1	Gelelektrophorese .....	44
3.1.2	Rasterkraftmikroskopie .....	47
3.2	Wirkung von CpG-Oligonukleotiden auf plasmazytoide dendritische Zellen ...	51
3.3	Wirkung von CpG-Oligonukleotid-beladenen Nanopartikeln .....	55
3.3.1	Herstellung von CpG-Oligonukleotid-beladenen Nanopartikeln .....	55
3.3.2	Einfluss auf die Zytokinproduktion .....	57
3.3.3	Aufnahme in plasmazytoide dendritische Zellen .....	60
3.4	Mechanismen der unterschiedlichen Wirkung von CpG-A und CpG-B .....	62
3.4.1	Blockade des Typ I IFN-Rezeptors .....	62
3.4.2	Aktivierung des BDCA-2-Moleküls .....	65
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	
4.1	Übersicht über die experimentellen Befunde .....	68
4.2	Strukturanalyse von CpG-Oligonukleotiden .....	71
4.2.1	Methodendiskussion .....	71
4.2.2	Diskussion der Ergebnisse .....	73
4.2.3	Vergleich mit der Literatur .....	83
4.3	Unterschiedliche Wirkung von CpG-A und CpG-B .....	86
4.3.1	Methodendiskussion .....	86
4.3.2	Diskussion der Ergebnisse im Horizont der Literatur .....	87
4.4	Klinische Relevanz .....	98
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	101
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	105
	Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme .....	115
	Danksagung .....	117
	Veröffentlichungen .....	118
	Lebenslauf .....	120

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Fragestellung

CpG-Oligodesoxynukleotide (ODN, kurz „Oligonukleotide“) sind kurze einzelsträngige Nucleinsäureketten, die für das menschliche Immunsystem die Anwesenheit bakterieller DNA imitieren. Sie stellen aufgrund ihrer immunstimulierenden Wirkung einen neuen vielversprechenden Therapieansatz dar. In ersten klinischen Studien wird derzeit ihr Einsatz als Vakzineadjuvans, als Antiallergikum und als antitumoraler Wirkstoff untersucht. CpG-Oligonukleotide werden vom TLR-9-Rezeptor (*Toll-like receptor 9*) erkannt. Plasmazytoide dendritische Zellen (PDCs) und B-Zellen sind die einzigen Zellen des Immunsystems, die diesen Rezeptor exprimieren. Plasmazytoide dendritische Zellen sind die Hauptproduzenten des antiviralen Zytokins IFN- $\alpha$  (IFN=Interferon) und spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr viraler Infektionen aber auch in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen. Kürzlich wurden zwei Klassen von CpG-ODN differenziert. Die Klasse A zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, hohe Mengen an IFN- $\alpha$  zu induzieren, wohingegen die Klasse B durch ihre B-Zell-stimulierenden Eigenschaften charakterisiert ist.

Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist es zu untersuchen, inwiefern sich diese beiden Klassen von CpG-ODN bezüglich ihrer Tertiärstruktur und ihrer Wirkung auf plasmazytoide dendritische Zellen unterscheiden. Daraus ergibt sich die zentrale Frage, ob ein Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung besteht.

Zunächst sollten Methoden zur Strukturanalyse von Oligonukleotiden etabliert werden, die Aufschluss darüber geben, inwiefern sich die beiden Klassen von CpG-Oligonukleotiden in ihrer Fähigkeit unterscheiden, inter- und intramolekulare Bindungen einzugehen und damit höhermolekulare Komplexe zu bilden. Falls Komplexbildung vorliegt, kann durch den Vergleich mit Kontroll-ODN geklärt werden, welche Strukturelemente die Komplexbildung bedingen. Die Wirkung der beiden CpG-Klassen auf plasmazytoide dendritische Zellen sollte anhand ausgewählter immunologischer Parameter, wie der Zytokinsynthese und der Expression von Oberflächenmolekülen, unter-

sucht werden. Durch die Blockade von Signalwegen mit Hilfe inhibitorischer Antikörper kann nach Hinweisen für die Verwendung unterschiedlicher Signalwege durch CpG-A und CpG-B gesucht werden. Zur Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung sollte geklärt werden, inwiefern die gezielte Veränderung der Struktur der Oligonukleotide, durch Bindung an Nanopartikel oder durch Veränderung der Sequenz deren Wirkung beeinflusst.

## 1.2 Die plasmazytoide dendritische Zelle

### 1.2.1 Immunologische Charakterisierung und Entdeckung

Im Jahre 1958 beschrieb K. Lennert als Erster die plasmazytoide dendritische Zelle histologisch [Lennert 1958]. Er bezeichnete sie damals als T-Zell-assoziierte Plasmazelle. Die gehäuft in Lymphknoten vorkommende Zelle zeichnet sich durch die Expression von CD4 (CD = *Cluster of differentiation*) und prä-TCR- $\alpha$ -Kette (TCR = *T-cell receptor*) sowie eine plasmazellartige Morphologie aus [Lennert 1958; Muller-Hermelink 1973; Lennert 1975]. Genauere Untersuchungen dieses Zelltyps ergaben, dass dieser auch myeloide Oberflächenmoleküle wie CD31, CD36, CD68 und die IL-3-Rezeptor- $\alpha$ -Kette (IL = Interleukin) exprimiert, welches zu einer Umbenennung dieses Zelltyps in „plasmazytoider Monozyt“ führte [Facchetti 1988]. Im Jahre 1994 entdeckte Steinman zwei unterschiedliche Subpopulationen von dendritischen Zellen: CD11c-positive und CD11c-negative dendritische Zellen [O'Doherty 1994]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die CD11c-negative Subpopulation der dendritischen Zellen identisch mit den plasmazytoiden Monozyten war, welche ab diesem Zeitpunkt plasmazytoide dendritische Zellen genannt wurden [Grouard 1997]. Unabhängig von diesen Erkenntnissen suchte man Anfang der 80er Jahre nach dem zellulären Ursprung der antiviralen Zytokine IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ . Man entdeckte, dass die Interferon-produzierenden Zellen eine äußerst kleine Zellpopulation des peripheren Blutes darstellen [Peter 1980; Abb 1983]. Nähere Untersuchungen ergaben, dass es sich bei dieser Population um CD3-negative, CD4-positive dendritische Zellen handelte [Ferbas 1994]. Im Jahre 1999 entdeckten zwei Forschergruppen unabhängig voneinander, dass die Interferon-produzierende Zelle

des peripheren Blutes identisch ist mit der plasmazytoiden dendritischen Zelle [Cella 1999; Siegal 1999].

Die PDC exprimiert, wie oben beschrieben, sowohl myeloide als auch lymphoide Oberflächenmoleküle. Ihr phylogenetischer Ursprung konnte bis dato noch nicht eindeutig geklärt werden. Comeau unterteilt die plasmazytoiden dendritischen Zellen in drei Subtypen, von denen zwei lymphoiden und einer myeloiden Ursprungs ist [Comeau 2002]. Nur die beiden PDC-Subtypen lymphoiden Ursprungs besitzen die Fähigkeit, hohe Mengen an Typ I IFN zu produzieren. Der Mangel an spezifischen Oberflächenmolekülen, die die Charakterisierung und Identifizierung der PDC ermöglichen, erschwerte die Versuche mit diesem seltenen Zelltyp. Ein Meilenstein war die Entdeckung der beiden PDC-spezifischen Oberflächenantigene BDCA-2 (BDCA = *blood dendritic cell antigen*) und BDCA-4 [Dzionek 2000]. Sie ermöglichte die Identifizierung der PDC und erlaubte eine einfache Isolation dieser Zellen. BDCA-4 wird jedoch auch auf dendritischen Zellen (DCs) exprimiert, die aus Monozyten und aus CD34-positiven Stammzellen generiert werden. Die Expression von BDCA-2 nimmt mit der Reifung der PDC ab, außerdem wird BDCA-2 auch von kortikalen Thymozyten exprimiert [Dzionek 2000].

### 1.2.2 Vorkommen und Funktion

Die plasmazytoiden dendritischen Zellen stellen eine kleine Population des peripheren Blutes dar. Die Häufigkeit innerhalb der mononukleären Zellfraktion des peripheren Blutes beträgt 0,1-0,7 %. PDCs finden sich in sekundären lymphatischen Organen, wo sie in der T-Zell-Region nahe der HEV (*high endothelial venules* = postkapilläre Venolen mit hohem Endothel) lokalisiert sind [Facchetti 1988; Dzionek 2000]. Das Vorkommen der PDC in gesunder Haut und Mukosa liegt im Bereich der Nachweisgrenze [Facchetti 1990; Jahnsen 2000; Wollenberg 2002].

Die plasmazytoide dendritische Zelle scheint auf die Erkennung von Viren spezialisiert zu sein. Sie ist die Typ I IFN-produzierende Zelle des menschlichen Körpers und ist verantwortlich für die Ausschüttung von Typ I IFN bei viraler Infektion. Die plasmazytoide dendritische Zelle stellt ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort dar [Kadowaki 2002]. Sie besitzt die Fähigkeit, potenzielle Krankheits-



erreger anhand charakteristischer Pathogen-assoziiertes molekularer Muster zu erkennen und eine auf die Bekämpfung des entsprechenden Erregers abgestimmte Immunantwort hervorzurufen. Die PDC wird aufgrund ihres Expressionsmusters an Toll-like-Rezeptoren (TLRs) nicht durch jegliche Art von pathogenen Bestandteilen aktiviert, sondern reagiert selektiv nur auf bestimmte Stimuli.

Die Toll-like-Rezeptoren wurden erst kürzlich entdeckt und dienen dem angeborenen Immunsystem dazu, Fremdkörper aufgrund Pathogen-assoziiertes molekularer Muster zu erkennen [Akira 2001]. Jede Zelle des Immunsystems ist durch ein anderes Expressionsmuster von Toll-like-Rezeptoren gekennzeichnet, von denen bis heute zehn verschiedene identifiziert werden konnten. Die plasmazytoide dendritische Zelle exprimiert TLR-9, TLR-7 sowie geringe Mengen an TLR-10, TLR-6 und TLR-1 [Kadowaki 2001b; Hornung 2002]. Sie reagiert somit direkt auf Liganden der genannten Toll-like-Rezeptoren. CpG-DNA (DNA = *desoxyribonucleic acid*) wird vom TLR-9-Rezeptor erkannt [Hemmi 2000; Bauer 2001b] und ist der einzige bekannte mikrobielle Stimulus, der PDCs direkt aktiviert. Imidazoquinoline sind Liganden des TLR-7-Rezeptors und aktivieren ebenfalls plasmazytoide dendritische Zellen [Hemmi 2002; Ito 2002]. Ihr biologisches Pendant wurde bisher nicht identifiziert.

Die Aktivierung unreifer PDCs durch virale und bakterielle Stimuli führt zu einer Steigerung der Expression von kostimulatorischen und Antigen-präsentierenden Molekülen sowie zur Ausschüttung von Zytokinen. Hierbei kommt insbesondere den Typ I Interferonen eine wichtige Rolle zu [Cella 1999; Cella 2000]. Die PDC ist die einzige Zelle des menschlichen Körpers, die es vermag, hohe Mengen an Typ I IFN zu synthetisieren (bis zu 10 pg IFN- $\alpha$  pro Zelle). Ein weiteres wichtiges Th1-Zytokin, das von unreifen PDCs nach Stimulation mit CpG-DNA und CD40-Ligand gebildet werden kann, ist IL-12 [Krug 2001b]. Weitere Zytokine und Chemokine, die von einer aktivierten PDC sezerniert werden sind IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-8. Durch die Ausschüttung von Zytokinen und über interzelluläre Wechselwirkungen können PDCs eine Vielzahl von anderen immunkompetenten Zellen aktivieren, wie Makrophagen, NK-Zellen (NK-Zellen = natürliche Killerzellen), NKT-Zellen und T-Zellen [Rothenfusser 2001; Gilliet 2002; Kadowaki 2002].

Die Aktivierung der unreifen PDC führt zu ihrer Ausreifung, die mit einem Verlust der Fähigkeit, IFN- $\alpha$  zu produzieren, einhergeht. Die reife PDC ist durch eine dendritische Morphologie gekennzeichnet. T-Zellen werden durch PDCs, die mit CpG-ODN oder mit Viren stimuliert wurden, in Richtung Th1 polarisiert [Cella 2000; Kadowaki 2000; Krug 2001b]. Reifen PDCs allerdings nicht in mikrobieller Umgebung, sondern in Gegenwart von IL-3 aus, so können sie eine Th2-Antwort induzieren [Rissoan 1999].

Ob die PDC als professionelle Antigen-präsentierende Zelle (APC) bezeichnet werden kann ist umstritten. Sie besitzt die Fähigkeit, nach Infektion mit Influenza-Virus Antigen zu präsentieren und Antigen-spezifische zytotoxische CD8-T-Zellen und TH1-CD4-T-Zellen zu expandieren [Fonteneau 2003]. Vergleicht man die PDC jedoch mit myeloiden DCs, so ist ihre Antigen-präsentierende Fähigkeit gering. Im Gegensatz zu myeloiden DCs scheinen PDCs nicht in der Lage zu sein, naive T-Zellen zu stimulieren und zu expandieren. Ihre Aufgabe besteht höchstwahrscheinlich in der Polarisierung und Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen [Krug 2003b].

### 1.2.3 Pathophysiologische Bedeutung

In der Pathogenese von HIV-Infektionen (HIV = *human immunodeficiency virus*), tumoralen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen kommt der plasmazytoiden dendritischen Zelle eine zentrale Rolle zu. Die PDC exprimiert CD4 sowie die HIV-Korezeptoren CXCR4 und CCR5 und wird von dem HIV-Virus infiziert [Patterson 1999; Patterson 2001]. Die Reduktion der Anzahl von PDCs und der Verlust ihrer Fähigkeit, IFN- $\alpha$  zu produzieren, geht bei einer HIV-Infektion einher mit einer erhöhten Viruslast und einer Zunahme an opportunistischen Infektionen [Donaghy 2001; Soumelis 2001]. Bei Langzeit-überlebenden HIV-Infizierten konnte eine erhöhte Anzahl an PDCs detektiert werden [Soumelis 2001].

Des Weiteren scheinen PDCs bei der antitumoralen Immunantwort eine Rolle zu spielen. Zou et al. zeigten, dass PDCs in peritumorale Bereiche von Ovarialtumoren rekrutiert werden und dort, durch die Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung eine Tumorspezifische Immunantwort verhindern [Zou 2001].

In der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen kommt den PDCs eine wichtige Bedeutung zu. Im Blut von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) wurden hohe Konzentration von Typ I IFN nachgewiesen, die den Plasmakonzentrationen von Gesunden nach einer Virusinfektion entsprachen [Ytterberg 1982]. Komplexe aus anti-dsDNA-Antikörpern (ds = Doppelstrang) und DNA im Serum der SLE-Patienten sind verantwortlich für die Induktion von Typ I IFN in PDCs von SLE-Patienten [Cederblad 1998; Vallin 1999]. In Hautläsionen von SLE-Patienten aber auch von Patienten mit Psoriasis fand sich eine erhöhte Anzahl von aktivierten PDCs [Blomberg 2001; Wollenberg 2002]. Außerdem wurden im Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose PDCs nachgewiesen [Pashenkov 2001]. Die gezielte Modulation der PDC stellt somit eine therapeutisch interessante Zielstruktur dar.

### 1.3 Typ I Interferon

Als Typ I Interferone werden die antiviralen Zytokine IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$  und IFN- $\tau$  bezeichnet. Es existieren 14 verschiedene Subtypen von IFN- $\alpha$ , die alle durch unterschiedliche Gene kodiert werden. IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$  und IFN- $\tau$  hingegen werden durch ein einziges Gen kodiert. Alle Typ I Interferone binden an den gleichen Rezeptor, den Typ I IFN-Rezeptor (IFN-R) [Katze 2002]. Die Hauptproduzenten von Typ I IFN im menschlichen Körper sind die PDCs, jedoch besitzen auch andere Zellen die Fähigkeit, Typ I IFN in geringen Mengen zu bilden. Der bekannteste Stimulus für die Synthese von Typ I IFN ist eine virale Infektion. Allerdings können auch Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* zur Sekretion von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  führen [Bogdan 2000; Weiden 2000]. Einige pathogene Bestandteile, die für die Aktivierung der Typ I IFN-Synthese notwendig sind, konnten bereits identifiziert werden. Der TLR-9-Ligand CpG-DNA und der TLR-3-Ligand dsRNA führen zu einer Aktivierung der Typ I IFN-Produktion [Kadowaki 2001a; Krug 2001a; Hemmi 2002]. Ebenso induzieren Imidazoquinoline die Typ I IFN-Synthese in PDCs, allerdings ist der natürliche TLR-7-Ligand noch nicht bekannt [Hemmi 2002; Ito 2002].

### 1.3.1 Produktion von Typ I Interferon

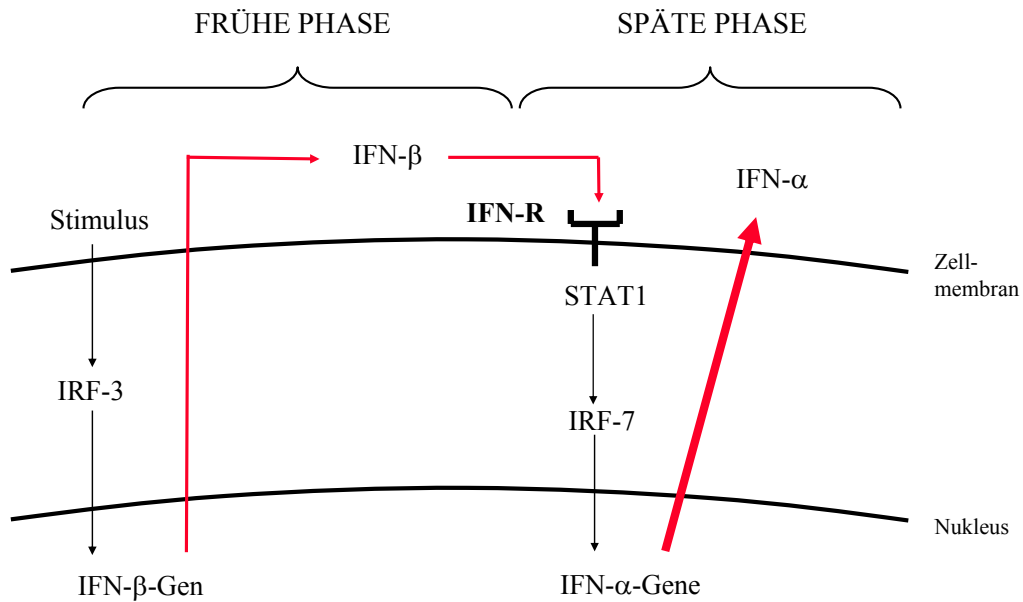
Die Aktivierung von Typ I IFN-Genen wird durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren reguliert. Neben NF- $\kappa$ B und ATF/c-jun kommt insbesondere den IRFs (*interferon regulatory factors*) eine besondere Bedeutung zu. Von den insgesamt neun verschiedenen IRFs spielen vor allem IRF-3 und IRF-7 eine wichtige Rolle bei der Induktion der Typ I IFN-Gene [Biron 2001; Katze 2002]. Das bis Mitte 2001 vorherrschende Konzept basierte auf der Annahme, dass die Typ I IFN-Produktion einem positiven Rückkopplungsmechanismus unterliegt, der die frühe und späte Phase der Typ I IFN-Produktion verbindet. Geringe Mengen an IFN- $\beta$  werden in einer frühen Phase gebildet und aktivieren den Typ I IFN-Rezeptor, welches zu einer verstärkten Synthese von IFN- $\alpha$  in der späten Phase führt. Die Aktivierung der Typ I IFN-Gene (insbesondere IFN- $\beta$ -Gen) in der frühen Phase ist abhängig von der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF-3. Die Aktivierung des Typ I IFN-Rezeptors führt über Stat/Jak-abhängige Signaltransduktionswege zu einer Aktivierung von einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, insbesondere von IRF-7. Die Phosphorylierung von IRF-7 und dessen nukleäre Translokation ruft die Aktivierung der späten IFN- $\alpha$ -Gene hervor [Marie 1998; Sato 1998]. Diese Erkenntnisse beruhen auf Versuchen mit murinen Fibroblasten und anderen Zelltypen wie myeloiden DCs (siehe Abb.1.1).

Die Erkenntnis, dass die PDC die IFN-produzierende Zelle des menschlichen Körpers ist, eröffnete neue Möglichkeiten, die Signaltransduktion und Entstehung von Typ I IFN in diesem Zelltyp zu untersuchen. Barchet widersprach als Erster dem herkömmlichen Konzept und zeigte, dass murine PDCs die Fähigkeit besitzen, hohe Mengen an IFN- $\alpha$  in einer frühen Phase, unabhängig vom Typ I IFN-Rezeptor zu synthetisieren [Barchet 2002].

Takauji et al. bestätigte diesen Befund für die humane PDC. Er bewies, dass IRF-7 konstitutiv exprimiert wird und dessen Aktivierung unabhängig vom Typ I IFN-Rezeptor in der frühen Phase der Typ I IFN-Produktion erfolgt [Takauji 2002] (siehe Abb. 1.1).

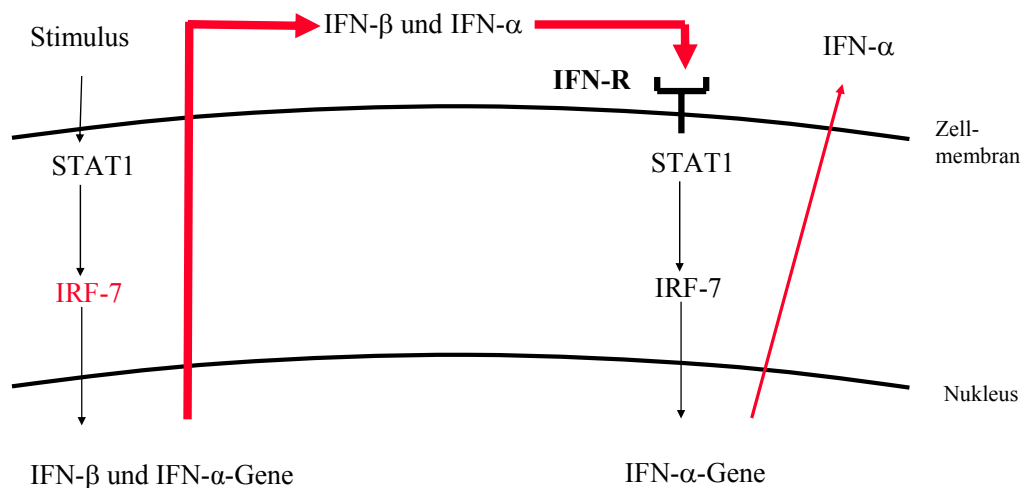
### Typ I IFN-Produktion - altes Modell:

(Marie 1998; Sato 1998)



### Typ I IFN-Produktion - neues Modell:

(Barchet 2002; Takaiji 2002)



**Abb. 1.1:** Vereinfachte Darstellung der Typ I IFN-Produktion nach dem alten und dem neuen Modell.

### 1.3.2 Wirkung von Typ I Interferon

Alle Wirkungen der Typ I Interferone werden über den Typ I IFN-Rezeptor vermittelt. Typ I Interferone haben antivirale Eigenschaften, welche auch ihren therapeutischen Einsatz bei viralen Infektionen wie Hepatitis C bedingen. Sie induzieren die Expression von antiviralen Transkriptionsfaktoren und Enzymen, wie z.B. dsRNA-aktivierte Serin-Threonin-Proteinkinase (PKR), 2'5'-Oligoadenylatzyklase (OAS) und RNase L. Die PKR inhibiert die Virusreplikation. OAS und RNase L degradieren virale mRNA [Katze 2002]. Typ I Interferone führen zu einer Erhöhung der Expression von MHC I-Molekülen auf Zellen. Dies führt zu einer verstärkten Präsentation von viralen Antigenen [Biron 1999; Biron 2001].

Neben den antiviralen Eigenschaften verfügen die Typ I Interferone auch über immunmodulierende Wirkungen, welche ihnen eine wichtige Stellung als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität verleihen. IFN- $\alpha$  führt zu der Ausreifung von myeloiden DCs und der Induktion von IL-10-produzierenden regulatorischen T-Zellen [Ito 2001]. Die lytische Aktivität von NK-Zellen und Makrophagen wird durch Typ I IFN erhöht [Ortaldo 1983]. Außerdem fördern die Typ I Interferone die Aktivierung und Proliferation von CD8-Gedächtnis-T-Zellen durch die Induktion von IL-15 [Zhang 1998]. IFN- $\alpha$  fördert das Überleben von T-Zellen [Marrack 1999] sowie die spezifische Antikörperproduktion und das Isotyp-Switching [Le Bon 2001].

### 1.3.3 Therapeutische Anwendung und Pathophysiologie

Die immunstimulatorischen Wirkungen von Typ I IFN bedingen deren Einsatz in der antitumoralen Therapie sowie bei viralen Infektionen [Mutschler 2001]. Rekombinant hergestelltes IFN- $\alpha$ -2a und IFN- $\alpha$ -2b wird bei chronischer Hepatitis B und C eingesetzt, sowie bei einer Vielzahl von Tumor-Erkrankungen. Eine Zulassung besteht für die folgenden Indikationen: Haarzell-Leukämie, malignes Melanom, chronische myeloische Leukämie, kutanes T-Zell-Lymphom, Nierenzellkarzinom, follikuläres Non-Hodgkin-Lymphom, multiples Myelom und Kaposi-Sarkom.

Des Weiteren kommt den Typ I Interferonen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu. 19 % der mit IFN- $\alpha$ -behandelten Patienten entwickeln eine Autoimmunreaktion [Ronnblohm 1991; Ioannou 2000]. Bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses wurden erhöhte Konzentrationen von Typ I IFN im Blut gemessen [Ronnblohm 2001]. Die Typ I Interferone spielen auch in der Pathogenese anderer Autoimmunerkrankungen wie Thyreoiditis, Polymyositis, rheumatoide Arthritis und Diabetes mellitus eine wichtige Rolle [Ronnblohm 2001]. Interessanterweise wird rekombinantes IFN- $\beta$  jedoch erfolgreich zur Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose eingesetzt.

### 1.4 CpG-Oligonukleotide

#### 1.4.1 Definition und geschichtlicher Hintergrund

Vor über hundert Jahren führte die Beobachtung des Amerikaners William Coley zur Grundsteinlegung der Immuntherapie von Tumoren. Er stellte fest, dass sich ein Sarkom nach einer bakteriellen Infektion im Bereich des Tumors zurückbildete und behandelte daraufhin mehrere Sarkom-Patienten mit bakteriellen Lysaten. Die Tumore bildeten sich bei einem Teil der Patienten vorübergehend zurück [Coley 1893; Nauts 1980]. Die Standardisierung von bakteriellen Lysaten war um die Jahrhundertwende nicht gegeben, und die einzelnen Komponenten des Immunsystems waren noch nicht identifiziert. Zudem zeigten andere Therapieansätze, wie die Strahlentherapie, bessere Resultate und rückten in den Mittelpunkt des Interesses. Die Fortschritte auf dem Gebiet der Immunologie führten zu einem besseren Verständnis des Wirkmechanismus bakterieller Lysate.

Tokunaga entdeckte 1984, dass der antitumorale und immunstimulatorische Effekt des bakteriellen Lysates von Tuberkulosebakterien durch die bakterielle DNA hervorgerufen wird [Tokunaga 1984]. Yamamoto zeigte 1992, dass die DNA von Bakterien, nicht aber die von Wirbeltieren, immunstimulatorische Aktivität aufweist [Yamamoto 1992]. DNA von Vertebraten und von Bakterien unterscheidet sich in einigen wesentlichen Punkten: Cytosin-Guanin-Dinukleotide (CG-Dinukleotide) treten in bakterieller DNA mit einer Häufigkeit von 1/16 auf, wohingegen sie bei Vertebraten-DNA nur mit einer

Häufigkeit von 1/60 vorkommen. 70 % der Cytosin-Moleküle in CG-Dinukleotiden der Vertebraten-DNA sind an der 5' Position methyliert. Im Gegensatz dazu sind alle Cytosin-Moleküle in CG-Dinukleotiden bakterieller DNA unmethyliert. Der Regulationsmechanismus, der der Supprimierung der CG-Dinukleotide in Vertebraten zu Grunde liegt, ist noch weitestgehend unbekannt und beruht u.a. auf der gezielten Mutation von methylierten Cytosin-Molekülen. Bei der oxidativen Desaminierung z.B. wird ein methyliertes Cytosin in ein Thymin umgewandelt. Durch den unterschiedlichen molekularen Aufbau der Vertebraten-DNA und der bakteriellen DNA wird dem humanen Immunsystem die Erkennung potenzieller Pathogene ermöglicht [Krieg 2002] - eine aus Sicht der Evolution hocheffiziente Abwehrstrategie der Wirbeltiere.

Durch die Entwicklung der Antisense-Technologie wurden Verfahren verfügbar, die die Synthese von DNA in großem Maßstab ermöglichten. Oligonukleotide (ODN) sind kurze, circa 20 Basen lange, einzelsträngige DNA-Moleküle. Die Antisense-Technologie verfolgt das Ziel, die Bildung eines einzelnen Proteins durch komplementäre Bindung eines Antisense-ODNs an die RNA zu hemmen. Arthur Krieg (University of Iowa) entdeckte bei Versuchen mit Antisense-ODN, dass einige dieser Oligonukleotide immunstimulatorische Eigenschaften besitzen. Synthetische DNA ist wie bakterielle DNA am Cytosin nicht methyliert. Arthur Krieg bewies, dass unmethylierte CG-Dinukleotide in einem bestimmten Basenkontext, sogenannte CpG-Motive, verantwortlich für den immunstimulatorischen Effekt von bakterieller und synthetischer DNA sind [Krieg 1995]. Oligonukleotide, die diese CpG-Motive enthalten, werden als CpG-ODN bezeichnet und sind das synthetische Pendant der bakteriellen DNA.

### 1.4.2 Wirkung auf das Immunsystem

Ein aktuelles Konzept in der Immunologie geht davon aus, dass das angeborene Immunsystem die Fähigkeit besitzt, potenzielle Krankheitserreger anhand molekularer Muster zu erkennen und eine auf die Bekämpfung des entsprechenden Erregers abgestimmte spezifische Immunantwort zu initiieren und zu steuern [Medzhitov 1997]. CpG-Motive innerhalb von DNA werden als molekulare Muster erkannt. Der erkennende Rezeptor ist der Toll-like-Rezeptor-9 (siehe Kapitel 1.2.2), der nur von plasmazytoiden dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert wird. Somit werden nur diese beiden



Zelltypen des Immunsystems direkt durch CpG-DNA aktiviert. Die Effekte von CpG-ODN auf andere Zellen des Immunsystems, wie Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen etc, sind daher indirekt. Sie werden über die von aktivierten PDCs und B-Zellen ausgeschütteten Zytokine sowie über Zell-Zell-Interaktionen vermittelt. CpG-DNA bahnt eine Th1-gerichtete Immunantwort [Krieg 2002; Rothenfusser 2002].

### Wirkung auf B-Zellen:

Die Stimulation mit CpG-ODN ruft in B-Zellen eine gesteigerte IL-6- und IL-10-Synthese [Gantner 2003] sowie eine erhöhte Sekretion von Immunglobulinen [Krieg 1995] hervor. Durch CpG-ODN wird die polyklonale Proliferation der B-Zellen [Bernasconi 2003] gefördert. Außerdem weist eine mit CpG-ODN stimulierte B-Zelle eine erhöhte Expression von Antigen-präsentierenden Molekülen (MHC II und MHC I), kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86, CD40) und Adhäsionsmolekülen (CD54 = ICAM-1 = *intercellular adhesion molecule*) [Bauer 1999; Hartmann 2000a] auf. Des Weiteren wurde beschrieben, dass CpG-ODN Apoptoseresistenz in B-Zellen induziert [Yi 1998]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Stimulation mit CpG-ODN zu einer Aktivierung von B-Zellen und zu der Entstehung von Immunglobulin-sezierenden Plasmazellen führt.

### Wirkung auf PDCs:

Die Wirkung von CpG-ODN auf plasmazytoide dendritische Zellen ist Gegenstand dieser Dissertation. Im folgenden sind die bislang verfügbaren Daten dargestellt:

Die Stimulation von PDCs mit CpG-ODN führt zu einer Steigerung der Expression kostimulatorischer und Antigen-präsentierender Moleküle, wodurch die Fähigkeit erhöht wird, allogene T-Zellen zu stimulieren [Krug 2001b]. CpG-DNA induziert die Produktion der Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  [Bauer 2001a; Krug 2001a; Krug 2001b]. Die Kombination der beiden Stimuli CpG-DNA und CD40-Ligand führt zu einer Synthese von IL-12 und dessen bioaktiver Form IL12p70 [Krug 2001b]. Diese Zytokine bahnen eine Th1-gerichtete Immunantwort. Die Aktivierung mit CpG-ODN induziert eine Aufregulation des Chemokin-Rezeptors CCR-7, der das Wandern von immunkompetenten Zellen in den Lymphknoten (auch *Homing* genannt) vermittelt [Cella 1999]. Die CpG-ODN-vermittelte Sekretion des Chemokins IP-10 führt zu der Rekrutierung von CXCR-3-exprimierenden Zellen, wie z.B. von aktivierten T-Zellen.

Weitere Chemokine, die von PDCs nach einer Stimulation mit CpG-ODN produziert werden, sind IL-8, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$ , die die Rekrutierung von Th1-Effektorzellen hervorrufen [Penna 2001].

### Differenzierung zweier Klassen von CpG-ODN:

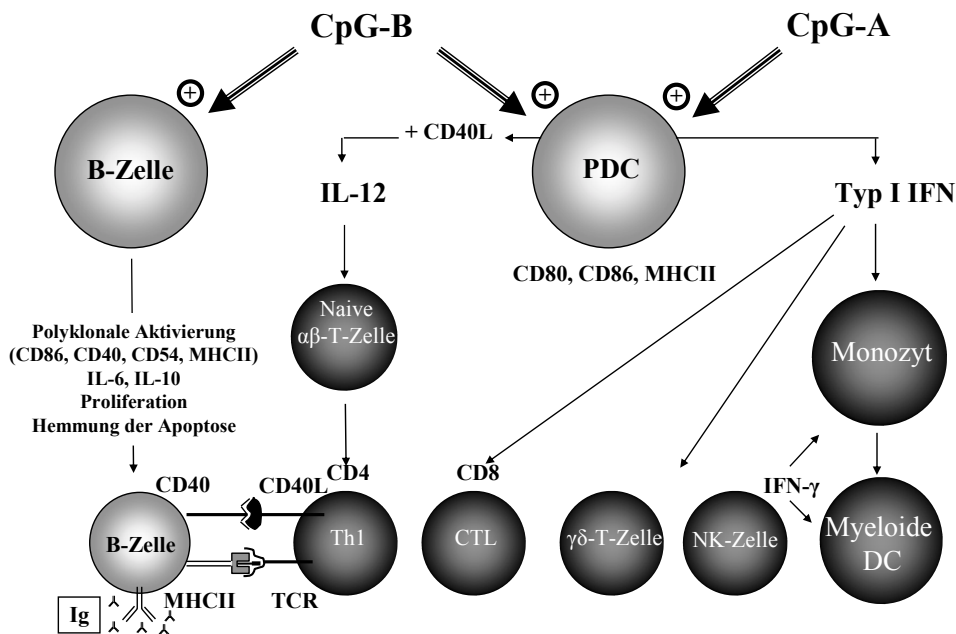
Durch Screening-Versuche gelang es, optimale CpG-ODN-Sequenzen zu identifizieren. Nicht nur die Existenz eines oder mehrerer CpG-Motive in der Sequenz des Oligonukleotides beeinflusst die Wirkung, sondern auch die Abfolge der flankierenden Basen oder die Existenz eines Palindroms. Im Laufe der Zeit wurden zwei CpG-ODN-Klassen definiert, die sich in ihrer Sequenz sowie in ihrer Wirkung wesentlich unterscheiden. Der Prototyp der CpG-ODN-Klasse A ist das CpG-ODN 2216 (CpG-A). Die Sequenz von CpG-A zeichnet sich aus durch Poly-G-Motive (Poly-Guanin-Motive), ein Palindrom im Zentrum und ein gefensteretes Rückgrat (an den Enden Phosphothioat-Bindungen, im Zentrum Phosphodiester-Bindungen). Der Prototyp der CpG-ODN-Klasse B ist das CpG-ODN 2006 (CpG-B), welches weder Poly-G-Motive noch Palindrom aufweist. Alle Bindungen von CpG-B sind Phosphothioatbindungen. Die beiden CpG-ODN-Klassen unterscheiden sich wesentlich in ihrer Wirkung. CpG-A-ODN induziert extrem hohe Mengen an IFN- $\alpha$  in PDCs [Krug 2001a]. B-Zellen werden jedoch kaum durch CpG-A aktiviert. Im Gegensatz dazu induziert CpG-B nur geringe Mengen an IFN- $\alpha$ , vermittelt jedoch eine starke Aktivierung von B-Zellen, welche sich in einer hohen IL-6-Produktion und einer Aufregulation kostimulatorischer und Antigen-präsentierender Moleküle manifestiert [Hartmann 2000a].

Die unterschiedlichen Wirkungen auf die beiden TLR-9-exprimierenden Zellen bedingen unterschiedliche sekundäre Effekte auf das Immunsystem. Durch die Induktion von Typ I IFN in PDCs führt CpG-A zu

1. der Induktion einer Antigen-unabhängigen Aktivierung von Gedächtnis-CD8-T-Zellen [Hornung 2002],
2. der Aktivierung von NK-Zellen, die sich in einer erhöhten lytischen Aktivität und einer gesteigerten IFN- $\gamma$ -Produktion manifestiert [Gursel 2002],
3. einer gesteigerten Proliferation, IFN- $\gamma$ -Produktion und lytischen Aktivität von  $\gamma\delta$ -T-Zellen [Rothenfusser 2001],

4. der Ausreifung von Monozyten und der Entwicklung eines DC-ähnlichen Phänotypes [Krug 2003a].

CpG-B hingegen induziert zusammen mit CD40-Ligand hohe Mengen an IL-12. IL-12 fördert das *Priming* von naiven CD4-T-Zellen und die Entstehung von Th1-Zellen [Gursel 2002]. Die Interaktion von Th1-Zellen und CpG-B-aktivierten B-Zellen führt zu der Entstehung einer humoralen Antwort (siehe Abb. 1.2).



**Abb.1.2:** Schematische Darstellung der Wirkung von CpG-A und CpG-B auf die Zellen des Immunsystems (zur Verfügung gestellt von Dr. G. Hartmann)

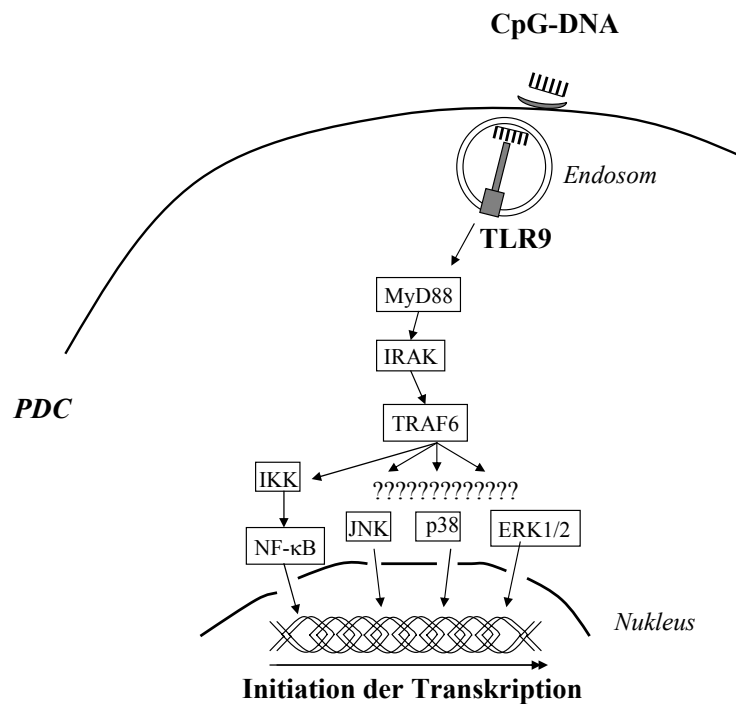
Kürzlich wurde eine dritte Klasse von CpG-ODN definiert, die sowohl B-Zellen aktiviert als auch PDCs zu einer hohen IFN- $\alpha$ -Produktion anregt [Hartmann 2003; Marshall 2003].

### 1.4.3 Wirkungsmechanismus

Aufgrund ihrer negativen Ladung können Oligonukleotide Zellmembranen nur schlecht passieren. Ihre zelluläre Aufnahme ist daher limitiert. Die verschiedenen Lymphozytenpopulationen unterscheiden sich in ihrer Kapazität, Oligonukleotide aufzunehmen. Für CpG-ODN ist lediglich die Aufnahme in B-Zellen und PDCs von Interesse. B-Zellen

weisen, verglichen mit anderen Lymphozytenpopulationen, eine hohe Aufnahmerate auf, die abhängig ist von dem Differenzierungsstadium der B-Zelle [Zhao 1994; Krieg 2002]. Die Aufnahme von Oligonukleotiden in PDCs wurde bis dato kaum untersucht. Die ODN-Aufnahme in Lymphozyten ist ein aktiver Prozess, der temperaturabhängig, sättigbar und in der Regel sequenzunabhängig ist. Eine Ausnahme sind jedoch Guaninreiche Oligonukleotide, da diese durch Scavenger-Rezeptoren auf den Zellen erkannt werden und daher besser als andere Oligonukleotide in die Zelle aufgenommen werden [Kimura 1994]. Die Rezeptor-vermittelte Endozytose ist der Hauptmechanismus bei der Aufnahme von Oligonukleotiden in niedrigen Konzentrationen, die bei CpG-ODN eingesetzt werden [Yakubov 1989; Beltinger 1995].

Nach der Aufnahme gelangen die Oligonukleotide in die Endosomen. Die endosomale Azidifizierung ist ein wichtiger Prozess für die weitere Wirkung der CpG-ODN. Chloroquin, ein Inhibitor der endosomalen Azidifizierung, hemmt die Wirkung von CpG-ODN [Macfarlane 1997]. Erst nach einer Azidifizierung des Milieus im endosomalen Kompartiment bindet CpG-DNA an TLR-9. Im Gegensatz zu anderen Toll-like-Rezeptoren wird TLR-9 kaum auf der Zelloberfläche exprimiert. Man nimmt an, dass der über eine Transmembran-Domäne verfügende TLR-9 in der endosomalen Membran lokalisiert ist [Hemmi 2000]. Die Aktivierung des TLR-9 führt zu der Rekrutierung des zytosolischen Adapterproteins MyD88 (*Myeloid differentiation marker 88*), welches die IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) aktiviert (siehe Abb 1.3). IRAK aktiviert den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6). Über noch nicht geklärte Signalwege werden letztendlich die Stresskinasen c-Jun-N-terminale Kinase (JNK), extrazelluläre Rezeptorkinase (ERK), p38 MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) und der I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK) aktiviert. IKK setzt aus I $\kappa$ B den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B frei [Wagner 2002].



**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus von CpG-ODN (zur Verfügung gestellt von Dr. G. Hartmann).

#### 1.4.4 Therapeutische Strategien

CpG-Oligonukleotide zeigen im Tiermodell therapeutische Wirksamkeit bei Infektionskrankheiten, Tumoren und allergischen Erkrankungen. Die therapeutischen Ansätze basieren auf den folgenden Strategien:

1. Die Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen und die Förderung der Antikörperproduktion macht CpG-ODN zu einem geeigneten Adjuvans bei prophylaktischen und therapeutischen Vakzinen:

Der Einsatz von CpG-ODN als Vakzineadjuvans führt in Kombination mit herkömmlichen Vakzinen zu einem schnelleren und effektiveren Impfschutz. Dies konnte im murinen System sowie auch in Studien mit Primaten belegt werden [Jones 1999; Davis 2000; Hartmann 2000b]. Durch den Einbau von CpG-Motiven konnte die Effektivität von DNA-Vakzinen verbessert werden. In einer ersten klinischen Studie wurde der Einsatz von CpG-ODN als Vakzineadjuvans

untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Koinjektion von CpG-ODN und HBsAg (*Hepatitis B surface antigen*) die Immunantwort im Vergleich zur Verabreichung von HBsAg alleine erheblich gesteigert werden konnte. 81 % der mit CpG-ODN und HBsAg behandelten Probanden wiesen nach der ersten Injektion detektierbare Antikörpertiter auf, im Vergleich zu 20 % der Kontrollgruppe (nur HBsAg) [Halperin 2003]. Derzeit wird in einer weiteren klinischen Studie der Einsatz von CpG-ODN als Adjuvans in Kombination mit einer herkömmlichen Hepatitis B-Vakzine (Engerix B) getestet. Die Zwischenanalyse ergab, dass auch hier durch den Einsatz von CpG-ODN als Vakzineadjuvans eine erhebliche Steigerung der Immunantwort erreicht werden konnte, sowohl bei gesunden Probanden, als auch bei Patienten mit Immundefekten (Patienten mit HIV-Infektion).

2. Die Stimulation des angeborenen Immunsystems durch CpG-ODN kann zur Therapie von Tumoren eingesetzt werden:

CpG-ODN wurde erfolgreich als Adjuvans bei der therapeutischen Vakzinierung gegen Tumorantigene in der Maus eingesetzt [Brunner 2000]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass CpG-DNA die Wirksamkeit von onkologisch eingesetzten therapeutischen Antikörpern wie z.B. Rituximab (Anti-CD20-Antikörper) verstärkt [Wooldridge 1997]. CpG-DNA alleine zeigte im Mausmodell einen antitumoralen Effekt, wenn es peritumoral injiziert wurde [Kawarada 2001; Heckelsmiller 2002a; Heckelsmiller 2002b]; zudem konnte ein antimetastasierender Effekt von CpG-ODN in der Maus nachgewiesen werden [Hafner 2001].

3. Die Induktion einer Th1-Antwort ist ein wichtiges therapeutisches Prinzip bei der Behandlung von Infektionskrankheiten mit intrazellulären Erregern und wirkt allergischen Reaktionen entgegen:

CpG-DNA schützt durch seine Th1-gerichtete mehrstufige Aktivierung des Immunsystems gegen eine nachfolgende Infektion mit intrazellulären Erregern wie Leishmanien und Listerien [Krieg 1998; Zimmermann 1998]. Kürzlich wurde im Mausmodell gezeigt, dass die postexpositionelle Gabe von CpG-ODN vor Prionen-Erkrankungen schützen kann [Sethi 2002]. Im Tiermodell konnte CpG-ODN erfolgreich zur Therapie des allergischen Asthmas eingesetzt werden

[Kline 1998; Sur 1999]. Als Adjuvans bei der Desensibilisierung gegen spezifische Allergene kann CpG-ODN eine TH1-gerichtete Immunantwort bahnen und damit die Ausprägung allergischer Reaktionen abschwächen [Parronchi 1999; Van Uden 1999].

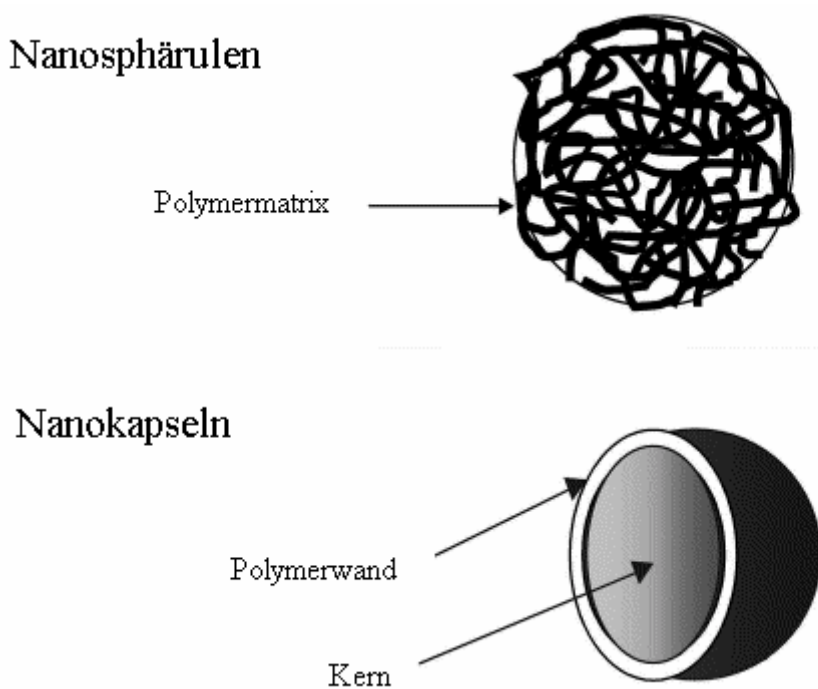
Ob CpG-DNA die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigt wird kontrovers diskutiert. Im Serum von Patienten mit Lupus erythematoses wurden Immunkomplexe bestehend aus Anti-dsDNA-Antikörpern und DNA detektiert, die verantwortlich sind für erhöhte IFN- $\alpha$ -Titer. Die in diesen Immunkomplexen enthaltene DNA weist CpG-Motive auf [Magnusson 2001b; Ronnblom 2001]. Außerdem fand man CpG-DNA in entzündeten Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Durch die Injektion von CpG-DNA in die Gelenke gesunder Mäuse wurden Gelenkentzündungen induziert [Wilbrink 1998; Deng 1999; Zeuner 2002]. Zahlreiche klinische Studien mit CpG-ODN und mit Antisense-ODN, die CpG-Motive enthalten, blieben jedoch ohne gehäuftes Auftreten von Autoimmunerkrankungen [Krieg 2002]. Diese Studien deuten darauf hin, dass CpG-DNA weder Toleranz aufhebt, noch die Produktion von Autoantikörpern induziert.

## 1.5 Nanopartikel

### 1.5.1 Definition und geschichtlicher Hintergrund

Nanopartikel wurden Mitte der 70iger Jahre von Speiser und Birrenbach entwickelt [Birrenbach 1976] und sind die jüngsten Vertreter der partikulären Wirkstoffträger, zu denen unter anderem Liposomen und Mikropartikel gehören. Nanopartikel sind feste kolloidale Partikel mit einer Größe von 20 bis maximal 1000 nm. Sie bestehen entweder aus natürlichen Polymeren wie z.B. Protamin, Albumin, Alginat u.a. oder aus biokompatiblen synthetischen Polymeren wie z.B. Polyalkylcyanoacrylat, Polymilchsäure u.a.. Grundsätzlich wird zwischen bioabbaubaren und nicht-bioabbaubaren Polymeren differenziert. Zu den bioabbaubaren Polymeren gehören z.B. Polyalkylcyanoacrylat und Polymilchsäure, wohingegen Polystyrol nicht bioabbaubar ist.

Je nach dem Aufbau der Nanopartikel wird zwischen Nanokapseln (*nanocapsules*) und Nanosphärulen (*nanospheres*) unterschieden (siehe Abb. 1.4). Nanokapseln bestehen aus einem festen, flüssigen oder gasförmigen Kern, in dem der Wirkstoff gelöst ist. Der Kern wird von einer Polymerwand umgeben. Nanosphärulen bestehen aus einer Polymermatrix, in die der Wirkstoff eingebettet wird. In beiden Fällen ist es möglich, den Wirkstoff entweder in den Nanopartikel einzuschließen oder an die Oberfläche zu adsorbieren.



**Abb. 1.4:** Darstellung von Nanokapseln und Nanosphärulen [Brigger 2002].

Es gibt zahlreiche Herstellungsverfahren, die zur Produktion von Nanopartikeln verwendet werden können. Man unterscheidet folgende Verfahrensarten: Phasentrennverfahren (Koazervation), mechanisch-physikalische Verfahren (Sprühtrocknung, Zentrifugalverfahren), Polymerisationsverfahren (Emulsions-Polymerisation, Grenzflächen-Polymerisation) und Dispersion von Polymeren (Hitze-Denaturierung, Desolvatation). Welches Herstellungsverfahren letztendlich gewählt wird, hängt von den physikalischen Eigenschaften des Polymers, aber auch von der gewünschten Größe der Nanopartikel ab.



Von Mikropartikeln und Liposomen können Nanopartikel wie folgt abgegrenzt werden: Wie die Namensgebung verdeutlicht, besteht der wesentliche Unterschied zwischen Mikropartikeln und Nanopartikeln in ihrer Größe. Während sich der Durchmesser der Nanopartikel im Submikronbereich bewegt, beträgt die Größe der Mikropartikel zwischen eins und fünf Mikrometern. Liposomen bestehen im Gegensatz zu Nano- und Mikropartikeln nicht aus Polymeren, sondern aus Phospholipiden.

### 1.5.2 Anwendung von Nanopartikeln

Die Anwendung von Nanopartikeln in der Medizin sowie in der Diagnostik ist vielversprechend. Zwar gibt es bisher noch kein zugelassenes Arzneimittel mit Nanopartikelformulierung, jedoch besitzen Nanopartikel im Vergleich zu den gleich großen Liposomen einige Vorteile, wie höhere Stabilität und einfachere Herstellung. Neben dem Einsatz als Wirkstoffträger, können Nanopartikel auch in der medizinischen Diagnostik (Zellisolation, Durchflusszytometrie) sowie in der chemischen Industrie (Nanoverkapselung von Farbstoffen) und Lebensmittelindustrie (Nanoverkapselung von Vitaminen und ätherischen Ölen) zum Einsatz kommen [Brigger 2002]. Die Vorteile, die die Bindung des Wirkstoffes an einen partikulären Träger bieten, sind zahlreich:

- Stabilitätserhöhung: Der Nanopartikel schützt den Wirkstoff vor Degradierung, wodurch eine längere Halbwertszeit und eine höhere Bioverfügbarkeit erreicht wird.
- Retardierung von Wirkstoffen: Durch die Wahl eines geeigneten Polymers kann die Freisetzung des Wirkstoffes aus dem Nanopartikel verzögert werden.
- Änderung des Aggregatzustandes: Überführung von flüssigen, insbesondere auch von flüchtigen Verbindungen in feste, frei fließende Pulver.
- Vermeidung von Unverträglichkeiten: Durch separate Einkapselung können Unverträglichkeiten zwischen mehreren Wirkstoffen oder zwischen Wirkstoff und Hilfsstoff vermieden werden.

- organspezifischer Wirkstofftransport (*Drug targeting*): Ziel des organspezifischen Wirkstofftransportes ist es, den Wirkstoff mit Hilfe galenischer Wirkstoffträgersysteme, wie z.B. Nanopartikel, direkt an seinen Wirkort zu transportieren. Durch diesen zielgerichteten Wirkstofftransport können Nebenwirkungen vermieden werden. Außerdem kann aufgrund des kleineren Verteilungsvolumens die Wirkstoffdosis reduziert werden. Es wird zwischen aktivem und passivem organspezifischen Wirkstofftransport unterschieden:

Beim **passiven *Drug targeting*** weisen die Trägersysteme keine Spezifität zum Zielorgan auf. Kolloidale Partikel wie z.B. Nanopartikel werden nach i.v. Injektion weitestgehend vom mononukleären phagozytären System (MPS = mononuclear phagocyte system) aufgenommen und reichern sich insbesondere in Leber, Milz, Lunge und Knochenmark an [Lenaerts 1984]. Bindet man einen Wirkstoff an Nanopartikel, so kann man gezielt Erkrankungen der oben genannten Organe therapieren. An Nanopartikel gebundenes Doxorubicin zeigte im Vergleich zu Doxorubicin alleine einen stärkeren antitumoralen Effekt auf Lebermetastasen im Mausmodell [Chiannikulchai 1989]. Die dosislimitierende Nebenwirkung von Doxorubicin ist dessen Kardiotoxizität. In einer klinischen Studie mit Hepatom-Patienten konnte durch die Bindung von Doxorubicin an Nanopartikel die Kardiotoxizität erheblich verringert werden. Die myelosuppressive Wirkung nahm jedoch zu [Kattan 1992]. Versuche, die Elimination der Partikel durch das MPS zu verhindern, führten zur *Stealth*-Technologie: Durch die Bindung langer hydrophiler Polymerketten (Polyethylenglykol (PEG) oder Poloxamer) an die Partikeloberfläche werden Nanopartikel vor Phagozytose und Opsonisierung geschützt und können länger in der Blutbahn zirkulieren [Gref 1994]. *Stealth*-Nanopartikel reichern sich insbesondere in Geweben an, die ein gefenstertes oder geschädigtes Endothel aufweisen. Gefenstertes Endothel findet sich z.B. in Leber und Nase, aber auch in einigen Tumorarten. Bei Gewebeschädigung durch Infektionen oder Infarkt kann die Integrität des Endothels zerstört werden. Erkrankungen mit chronisch-entzündlichem Verlauf, wie die rheumatoide Arthritis, führen zu einer Schädigung des Endothels [Moghimi 2001].

Beim **aktiven *Drug targeting*** weist das Transportsystem eine Spezifität zum Zielorgan auf. Durch Einbau einer spezifischen Leitsubstanz, einem *Targeter*, in

das Trägersystem soll die Erkennung und somit die Anreicherung im Zielorgan gewährleisten werden. Ein Beispiel hierfür sind Organ- oder Gewebe-spezifische Antikörper, die an die Partikeloberfläche gebunden werden. Die Bindung von Folat an Nanopartikel führte zu einer erhöhten Aufnahme in Tumorzellen, da diese Folat-Rezeptoren überexprimieren [Stella 2000].

### 1.5.3 Nanopartikel als Trägersysteme für Nucleinsäuren

Nucleinsäuren werden schnell degradiert und passieren aufgrund ihrer negativen Ladung nur schlecht die Zellmembran [Juliano 1999]. Dies erschwert das Arbeiten mit therapeutischen Nucleinsäuren wie Oligonucleotiden und siRNA. Um die Aufnahme von Nucleinsäuren in die Zelle zu erhöhen wurden zahlreiche Nucleinsäure-Transportsysteme entwickelt, von viralen Vektoren, über Lipidsysteme wie Lipofektin bis zu Liposomen und Mikropartikeln. Zur Transfektion von Zellen eignen sich auch physikalische Verfahren, wie Elektroporation und Schockwellen [Tschöep 2001]. Nanopartikel können ebenfalls als Trägersysteme für Nucleinsäuren eingesetzt werden [Lambert 2001a]. Durch die Bindung von Oligonucleotiden an Nanopartikel konnte deren Aufnahme, Stabilität und Wirkung verbessert werden [Tondelli 1998]. Die negativ geladenen und hydrophilen Oligonucleotidmoleküle lassen sich jedoch nur schwer an inerte Polymerpartikel binden, beziehungsweise in sie einbetten. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Oligonucleotide an Nanopartikel zu binden [Lambert 2001a]:

1. Herstellung positiv geladener Nanopartikel:

Positiv geladene Moleküle wie CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) oder DEAE-Dextran (DEAE = Diethylaminoethyl) werden kovalent an die Partikeloberfläche gebunden [Zobel 1997; Lambert 2001a]. Hierdurch entsteht ein positiv geladener Nanopartikel, an den sich die anionischen Oligonucleotidmoleküle adsorbieren lassen.

2. Herstellung von Nanokapseln mit hydrophilem Kern:

Die hydrophilen Oligonucleotide können in den wässrigen Kern von Nanokapseln eingebettet werden [Lambert 2001b].

### 3. Herstellung von Oligonukleotid-Nanosphärulen:

Durch die Reaktion von Oligonukleotiden mit positiv geladenen Naturstoffen, wie Alginaten, Polylysin oder Protamin, können Oligonukleotid-Nanosphärulen hergestellt werden [Aynie 1999; Junghans 2000].

Durch die Synthese neuer biokompatibler Polymere, die Entdeckung neuer Naturstoffe und die Entwicklung von Herstellungsverfahren nimmt die Diversität von Nanopartikelsystemen stetig zu. In den hier vorgestellten Experimenten wurden Protikel und positiv geladene *Stealth*-Polystyrolnanopartikel verwendet.

#### - Protikel:

Als Protikel werden Nanosphärulen bezeichnet, die aus Protamin und Oligonukleotiden bestehen. Protamin ist ein relativ kleines polykationisches Peptid mit einem Molekulargewicht von circa 4000 Dalton. Protamin zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, DNA zu kondensieren. In Fischsperma (insbesondere vom Lachs) kondensiert Protamin die DNA und bringt diese zum Kern der Eizelle nach der Befruchtung. Protamin besteht zu 2/3 aus Argininresten und enthält mehrere Aminosäuresequenzen, die ein nukleäres Lokalisationssignal darstellen [Junghans 2000]. In der pharmazeutischen Industrie findet Protamin seit über 30 Jahren Anwendung als Hilfsstoff für retardierte Insulinzubereitungen. Protaminsulfat oder Protaminhydrochlorid werden als Heparinantagonisten verwendet.

#### - Positiv geladene *Stealth*-Polystyrolnanopartikel:

Die Verwendung des kationischen Polymerisationsinitiators AIBI (2,2'-Azobis(2-(2-imidazoline-2-yl)propane)dihydrochlorid führte zu einer positiven Oberflächenladung der Nanopartikel. Um eine sterische Stabilisierung der Nanopartikel (*Stealth*-Technologie) zu erreichen, wurden hydrophile Poloxamer-338-Moleküle an die Nanopartikeloberfläche gebunden. Polystyrol ist ein nicht bioabbaubares Polymer. Es ist nur bedingt für medizinische Zwecke verwendbar, da es vom Körper nicht abgebaut werden kann. Ein Vorteil ist jedoch, dass sich keine toxischen Abbauprodukte bilden, die zum Teil bei der Degradierung bioabbaubarer Polymere entstehen können. Polystyrolnanopartikel finden aufgrund ihrer nicht immunogenen Eigenschaften und ihrer geringen Zytotoxizität

Anwendung *in vitro* und *in vivo* [Jani 1989; Blunk 1993; Menei 1994; Fritz 1997].

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Verwendete Oligonukleotide

Name	Typ	Sequenz vom 5' zum 3' Ende
CpG-B-ODN (2006)	CpG-B	<b>tcg tcg</b> ttt tgt <b>cgt</b> ttt gtc <b>g</b> tt
CpG-A-ODN (2216)	CpG-A	ggG GGA <b>CGA</b> TCG TC <b>g</b> ggg gG
CpG-Apc-ODN	Kontrolle zu CpG-A: Poly C statt Poly G	ccC CCA <b>CGA</b> TCG TCc ccc cC
CpG-Aop-ODN	Kontrolle zu CpG-A: Palindrom zerstört	ggG GGT <b>CGA</b> ACG TC <b>g</b> ggg gG
GpC-A-ODN (2243)	GC-Kontrolle zu CpG-A	ggG GGA GCA TGC TGc ggg gG
ODN 2017	Kontroll- Phosphothioat-ODN	ccc ccc ccc ccc ccc ccc cc
ODN 2137	GC-Kontrolle zu CpG-B	tgc tgc ttt tgt gct ttt gtg ctt
ODN Tet 1.5		GGGGTTGGGG

**Tab. 2.1:** Übersicht zu den verwendeten Oligonukleotiden:  
Kleinbuchstabe: Phosphothioat-Bindung; Großbuchstabe: Phosphodiester-Bindung am 3' Ende der Base; fett: CpG-Dinukleotide.

Die Oligonukleotide wurden von Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, MA, USA) oder von Metabion GmbH (Martinsried) bezogen. In Tabelle 2.1 ist eine Übersicht aller verwendeten Oligonukleotide zu sehen. Die Stocklösungen wurden je nach Versuchsbedingungen wie folgt angesetzt. Zur Strukturanalyse wurden die lyophilisierten Oligonukleotide direkt in dem entsprechenden Puffer (siehe 2.1.3) gelöst; weitere Verdünnungen wurden mit diesem Puffer vorgenommen. Für die Zellkultur wurden die Stocklösungen in TE-Puffer angesetzt; für weitere Verdünnungen wurde PBS verwendet. Für die Nanopartikelherstellung wurden die lyophilisierten Oligonukleotide in Phosphatpuffer oder in Wasser für Injektionszwecke aufgelöst. Alle ODN-Lösungen waren endotoxinfrei.

### 2.2 Strukturanalyse von CpG-Oligonukleotiden

#### 2.2.1 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Standardmethode um DNA-Fragmente zu separieren, zu identifizieren oder zu reinigen. Die elektrophoretische Mobilität von Nukleinsäuren hängt nicht nur von ihrer absoluten Masse, sondern auch von ihrer Form ab (superhelikal, offen, doppelsträngig oder einzelsträngig). Die Wanderung der Nukleinsäuren im elektrischen Feld kann durch zwei Theorien beschrieben werden [Lottspeich 1998]: Der Ogston-Siebeffekt beruht auf der Annahme, dass Nukleinsäuren in Lösung eine globuläre Form annehmen. Je größer der Umfang der Nukleinsäuren, desto öfter treten Kollisionen mit der Gelmatrix auf, und die Wanderung der Moleküle im elektrischen Feld wird gebremst. Sehr große Moleküle, deren Umfang größer als die durchschnittliche Porengröße des Gels ist, sollten dieser Theorie zufolge kaum durch das Gel wandern. Die zweite Theorie, die sogenannte Reptationstheorie, geht davon aus, dass Nukleinsäuren im elektrischen Feld ihre globuläre Form aufgeben und sich entlang des elektrischen Feldes ausrichten. Die Wanderung erfolgt mit einem Ende voran durch die Poren der Matrix (*end to end migration*). Dies erinnert an eine schlangenartige Bewegung des linearen Moleküls. Die Größenselektion erfolgt hier aufgrund der Tatsache, dass längere DNA-Moleküle sich langsamer fortbewegen als kürzere.

Die hier etablierte Gelelektrophorese sollte der Analyse der Komplexbildung einzelsträngiger Oligonukleotide im Größenbereich von 20-24 bp dienen. Daher wurde die für diesen DNA-Größenbereich geeignete Polyacrylamidgelelektrophorese gewählt. Es wird zwischen nativer und denaturierender Gelelektrophorese differenziert. Einzelsträngige DNA neigt dazu intra- und intermolekulare Bindungen einzugehen. Dies führt zu der Ausbildung von Sekundärstrukturen und zu einem veränderten Laufverhalten im Gel. Im nativen Gel können diese Sekundärstrukturen analysiert werden. Bei der denaturierenden Gelelektrophorese wird dem Gel Harnstoff zugesetzt, der die intra- und intermolekularen Bindungen auflöst. Somit hängt die elektrische Mobilität der einzelsträngigen DNA im denaturierenden Gel nur von ihrem Molekulargewicht ab. Die Trennung von DNA-Molekülen, die sich in ihrer Länge nur um ein Nukleotid unterscheiden, ist hier möglich. Um die Oligonukleotide auf dem Gel detektieren zu können,

wurden sie mit radioaktivem Phosphor ( $^{32}\text{P}$ ) markiert. Hierbei wird eine Phosphatgruppe mit  $^{32}\text{P}$  an das 5`Ende der Oligonukleotide angehängt. Alle Versuche wurden im Institut für Immunologie (Frau Prof. J. Johnson), Fachbereich Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), durchgeführt.

### 1. Anfertigung der Gele:

Es wurden zwei verschiedene Polyacrylamidgele (nativ und denaturierend) verwendet.

#### a) Zusammensetzung des nativen Polyacrylamidgels:

- 20 % Acrylamid (hergestellt aus 30 % Acrylamid/Bis Solution 19:1, BioRad, München)
- 1×TBE (89 mM Tris-borat, 2 mM EDTA; pH 8,0) (Apotheke Klinikum Innenstadt, LMU)
- Wasser für Injektionszwecke ad 100 ml ( Braun Melsungen AG, Melsungen)
- Zur Initiation der Polymerisation: 700 µl 10 % Ammoniumpersulfat (Serva, Heidelberg) und 35 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) (Sigma, München) für ein Gesamtvolumen von 100 ml.
- Auftragspuffer: 20 % Sucrose (Merck KGaA, Darmstadt), 0.05 % Bromphenolblau (Sigma, München), 0.05 % Xylencyanol (Sigma, München), 1×TBE

#### b) Zusammensetzung des denaturierenden Polyacrylamidgels:

- 19 % Acrylamid
- 1×TBE
- 8 M Harnstoff (Biomol, Hamburg)
- Wasser für Injektionszwecke ad 100 ml
- Zur Initiation der Polymerisation: 700 µl 10 % Ammoniumpersulfat und 35 µl TEMED für ein Gesamtvolumen von 100 ml.
- Auftragspuffer: 80 % Formamid (Sigma, München), 0.05 % Bromphenolblau, 0.05 % Xylencyanol, 1×TBE

Als Laufpuffer für beide Gele wurde 1×TBE verwendet. Die polymerisierende Gellösung wurde nach Zugabe von APS und TEMED unverzüglich zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch Abstandhalter an den Seiten getrennt waren.



### 2. Radioaktive Markierung der Oligonukleotide:

Die Oligonukleotide wurden mit radioaktivem  $^{32}\text{P}$ -ATP (Redivue adenosine 5'- $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -triphosphate; Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) am 5'-Ende markiert. Hierzu diente ein 5'-End-Labeling-Kit (Amersham Pharmacia Biotech). Mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase wurde an das 5'-Ende der Oligonukleotide, eine Phosphatgruppe mit  $^{32}\text{P}$  angehängt. Dies erfolgte durch Inkubation der Oligonukleotide, mit  $^{32}\text{P}$ -ATP und T4-Polynukleotidkinase für 30 Minuten. Nach Zugabe von STE-Puffer (10 mM TrisHCl, 10 mM EDTA; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurde die Lösung über eine kleine Säule (Nucltrap<sup>®</sup> Probe Purification Columns, Stratagene, Cedar Dreek, TX, USA) eluiert. Hierdurch wurde die Reaktion gestoppt und überschüssiges  $^{32}\text{P}$ -ATP und ADP eliminiert. Die Bestimmung der Radioaktivität (cpm) erfolgte mittels eines Beta-Counters (Beckman LS1801, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Alle Lösungen wurden mit dem Auftragspuffer verdünnt, so dass sie die gleiche Menge an  $^{32}\text{P}$  enthielten. Bei der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese diente ein Oligonukleotid-Größen-Marker (Amersham Pharmacia Biotech) zur Größenbestimmung der Oligonukleotide. Dieser besteht aus einem Gemisch von mehreren Oligonukleotiden mit einer Länge von 8-32 bp. Die Markierung des Oligonukleotid-Größen-Markers mit  $^{32}\text{P}$ -ATP erfolgte nach einem dafür vorgesehenen Protokoll. Für die Untersuchung der Komplexbildung unter physiologischen Salzkonzentrationen wurden  $^{32}\text{P}$ -markierte Oligonukleotide, die in PBS (phosphate buffered saline, Phosphatpuffer) gelöst waren, von der Firma Hartmann Analytics (Braunschweig) bezogen. Die Konzentration der verschiedenen radioaktiven ODN-Lösungen betrug zwischen 0,3 und 0,6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

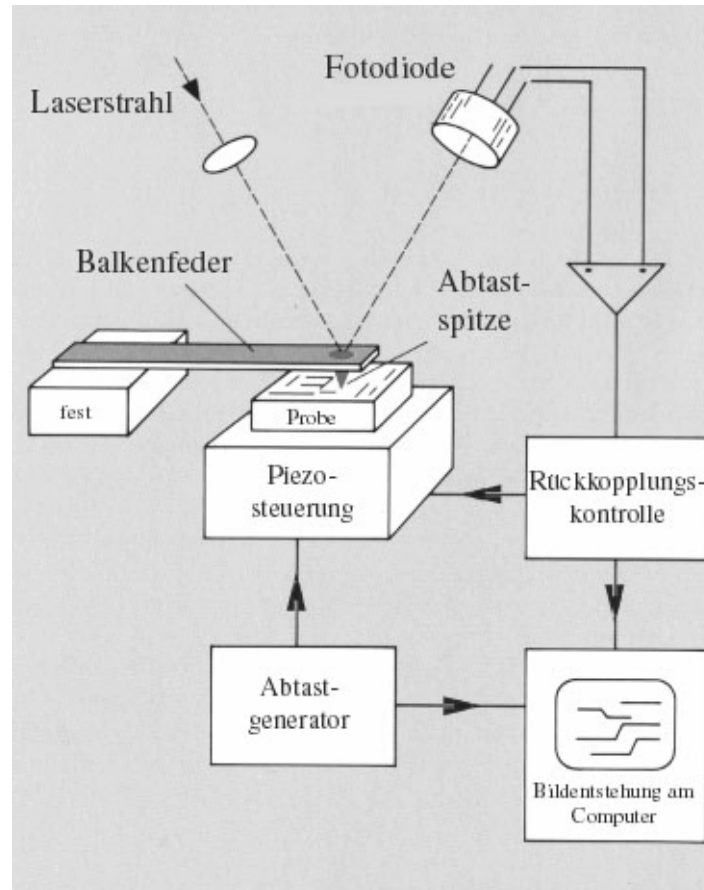
### 3. Durchführung der Gelelektrophorese:

Nach Abschluss der Polymerisation wurde das Gel mit der großen Glasplatte nach außen vertikal in den Gelrahmen der Elektrophoreseapparatur eingespannt. Anschließend wurden die Elektrophoresekammern mit Laufpuffer gefüllt. Der zuvor mit der geraden Seite nach unten eingesetzte Probenkamm wurde entfernt, gesäubert und mit den Zinken nach unten in das Gel eingesetzt. Nach Anschluss der Elektrophoreseapparatur an ein Netzgerät, wurde ein Vorlauf ohne Proben bei maximaler Voltzahl vorgenommen. Danach wurden 6  $\mu\text{l}$  jeder Probe in die Probenkanäle eingefüllt. Bei der nativen Gelelektrophorese betrug die angelegte Spannung 320 Volt, die Stromstärke 83 Ampere und die elektrische Feldstärke 8 V/cm. Bei der denaturierenden Gelelektrophorese wurde eine Spannung von 1500 Volt und eine Stromstärke von 83 Ampere angelegt. Die elekt-

rische Feldstärke betrug hier 40 V/cm. Die Elektrophorese wurde gestoppt, als das Bromphenolblau des Auftragspuffers  $\frac{3}{4}$  der Platte passiert hatte. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer genommen und von einer Glasplatte abgelöst. Die zweite Glasplatte mit dem Gel wurde mit Frischhaltefolie umwickelt. Unter Ausschluss von Licht wurde ein Film aufgelegt, exponiert und anschließend entwickelt.

### 2.2.2 Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop (RKM) auch *Atomic force microscope* (AFM) genannt, wurde von Gerd Binnig und Heinrich Rohrer Anfang der 80er Jahre entwickelt [Binnig 1986]. Das RKM ist ein hochauflösendes Mikroskop und erreicht eine laterale Auflösung von einem Nanometer und eine vertikale Auflösung von 0,1 Nanometer. Es funktioniert nach dem folgenden Prinzip: Die Probenoberfläche wird zeilenweise mit einer Abtastspitze abgerastert (siehe Abb. 2.1). Die Spitze berührt im Idealfall nicht die Probenoberfläche, sondern nähert sich ihr bis auf wenige Zehntel Nanometer an. Die exakte Ansteuerung der Probe erfolgt durch piezoelektrische Stallelemente. Die zwischen Abtastspitze und Probenoberfläche wirkenden Kräfte führen zu einer Auslenkung der Balkenfeder (*Cantileaver*), an der die Abtastspitze befestigt ist. Mit Hilfe eines auf der Rückseite der Balkenfeder reflektierten Laserstrahles kann die Ablenkung der Balkenfeder detektiert werden. Das Signal des Laserstrahles wird von einer in vier Felder geteilten Photodiode empfangen, die die vertikale und die laterale Auslenkung detektiert. Über den Regelkreis aus Rückkopplungskontrolle, Piezosteuerung und Abtastgenerator wird das auf der Photodiode empfangene Signal im Computer berechnet und in ein Bild umgewandelt.



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der Bildentstehung im Rasterkraftmikroskop (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Thalhammer).

Es existieren verschiedene Betriebsarten des Rasterkraftmikroskops, die sich in der Art der Wechselwirkung der Spitze mit der Probenoberfläche unterscheiden. Bei den hier durchgeführten Messungen wurden der Kontakt-Modus und der Klopf-Modus verwendet. Beim Kontakt-Modus nähert sich die Probenspitze der Oberfläche an und rastert sie zeilenweise ab. Nachteil dieser Methode ist, dass die Ziehbewegung der Probenspitze zu einer Beschädigung der Probe führen kann. Bei Messungen im Klopf-Modus wird die Spitze periodisch in Kontakt mit der Oberfläche gebracht. Hierzu wird die Balkenfeder mit Hilfe eines piezoelektrischen Kristalls zur Schwingung angeregt. Die Schwingung liegt nahe der Eigenresonanz der Balkenfeder. Die schwingende Balkenfeder klopft die Oberfläche zeilenweise ab. Diese Messmethode ermöglicht hochauflösende topographische Aufnahmen von Proben, die leicht zerstört werden können oder nicht sehr fest an die Probenunterlage binden.

### Probenpräparation:

Ein wesentlicher Punkt der Probenpräparation ist es, die Proben auf einer Unterlage ausreichend fest zu fixieren, so dass sie während des Messvorganges nicht verschoben werden. Glimmer ist ein Schichtsilikat dessen Oberfläche negativ geladen ist und eignet sich sehr gut als Unterlage für nukleinsäurehaltige Proben. Um die negativ geladene DNA auf der Glimmeroberfläche fixieren zu können, eignen sich vor allem Lösungen mit zweiwertigen Kationen (z.B. Magnesium). Weitere wichtige Aspekte, die bei der Probenpräparation beachtet werden sollten, sind die Wahl der optimalen Probenkonzentration, eine homogene Verteilung der Probe auf dem Glimmer und eine optimale Trocknung der Probe. Außerdem sollte beim Arbeiten mit salzhaltigen Lösungen ein Auskristallisieren verhindert werden.

Die Etablierung eines optimalen Protokolls für die Probenpräparation ist der wichtigste und schwierigste Punkt bei Arbeiten mit dem Rasterkraftmikroskop. Zahlreiche Optimierungsversuche führten zu folgendem Protokoll: Mit Hilfe eines Klebebandes wurde die obere Schicht eines Glimmerplättchens (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) abgezogen, so dass eine atomar glatte Oberfläche vorlag. Auf diese wurden 20 µl einer 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung (Sigma, München) aufgetropft. Nach einer Inkubationszeit von drei Minuten wurde die Oberfläche mit Wasser für Injektionszwecke gewaschen und mit Stickstoffgas getrocknet. Im Anschluss daran wurden 5 µl der ODN-Lösung auf die Glimmeroberfläche getropft. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten wurde die Oberfläche mit Wasser für Injektionszwecke gespült um ein Auskristallisieren der Salzlösung zu verhindern. Anschließend wurden die Proben zunächst im Luftstrom einer Werkbank mit laminarem Luftstrom (*Laminar air flow*) und danach mit Stickstoffgas getrocknet. Schließlich wurden die Proben mit dem Rasterkraftmikroskop gemessen. Die Konzentrationen der ODN-Lösungen betragen 6 oder 250 µg/ml. Es wurden drei verschiedene Lösungsmittel verwendet:

- Dulbeccos PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (Ionenkonz.: 4,2 mM K<sup>+</sup>, 139 mM Na<sup>+</sup>) (PAA Laboratories, Linz, Österreich)
- RPMI-Medium (Ionenkonz.: 5,4 mM K<sup>+</sup>, 128 mM Na<sup>+</sup>; 0,4 mM Mg<sup>2+</sup>; 0,45 mM Ca<sup>2+</sup>) (PAA Laboratories, Linz, Österreich)
- *G-wire*-Puffer [Marsh 1995]: 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl; pH: 7,0 (Chemikalien von Merck KGaA, Darmstadt)

Je nach Art des Messmodus wurden unterschiedliche *Cantileaver* verwendet: für den Kontakt-Modus *Cantileaver* des Typs CSC21/without Al/50 (Spitze A, Ultrasharp, Langen); für den Klopf-Modus *Cantileaver* des Typs NSC11 (Resonanzfrequenz 45 kHz, Ultrasharp). Alle Messungen wurden mit einem Topometrix® Rasterkraftmikroskop (Veeco, Unterschleißheim) bei einer Luftfeuchtigkeit von ~ 40 % durchgeführt. Die entstandenen Bilder wurden mit dem Programm SPIP (Image Methrology, Dänemark) bearbeitet und ausgewertet. Arbeiten mit dem Rasterkraftmikroskop wurden am Institut für Geo- und Umweltwissenschaften (Prof. W. Heckl) der Ludwig-Maximilians-Universität München, durchgeführt.

### 2.3 Isolation und Kultur plasmazytoider dendritischer Zellen

#### 2.3.1 Isolation plasmazytoider dendritischer Zellen

*Buffy coats* wurden aus dem Vollblut gesunder Spender gewonnen und vom bayrischen Roten Kreuz München und dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Greifswald zur Verfügung gestellt. Als *Buffy coat* bezeichnet man die Leukozytenmanschette, die man beim Abzentrifugieren von Vollblut erhält. Diese besteht aus den plasmafreien zellulären Bestandteilen des Blutes mit einem reduzierten Gehalt an Erythrozyten. Die Isolation der PBMCs (*Peripheral blood mononuclear cells* = mononukleäre Zellfraktion des peripheren Blutes) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation über „Ficoll-Hypaque“-Lösung (Biochrom KG, Berlin). Die *Buffy coats* wurden hierzu auf vier 50 ml-Röhrchen (*Blue caps*) verteilt, die zuvor mit je 15 ml Ficoll-Hypaque gefüllt worden waren. Anschließend wurde mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) auf 50 ml aufgefüllt, ohne dabei die Phasen zu vermischen. Nach einer Zentrifugation (1000 g, 20°C, 15 min, Beschleunigung 1, Bremsung 1) fand man in jedem *Blue cap* von oben nach unten die folgende Schichtung vor: Plasma, mononukleäre Zellen (PBMC), Ficoll, Erythrozyten und andere Zellen (Thrombozyten, Granulozyten). Der PBMC-Ring wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues *Blue cap* gegeben, mit steriler physiologischer Kochsalzlösung auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1590 rpm, 20 °C, 15 min, Beschleunigung 9,

Bremung 4). Die gewonnene Zellfraktion wurde ortholysiert (Ortho-mune Reagenz, Ortho Clinical Diagnostics, Neckargemünd), um verbleibende Erythrozyten zu beseitigen. Nach einem anschließenden Waschschrift wurde die Viabilität der Zellen durch Ausschluss der Trypanblau-gefärbten Zellen bestimmt. Die Viabilität belief sich in der Regel auf > 95 %.

Die Isolation der PDCs aus den gewonnenen PBMCs erfolgte mittels magnetischen Zellsortens (MACS = *magnetic cell sorting*). Hierzu wurde nach dem Protokoll von Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach) zur Isolation plasmazytoider dendritischer Zellen mit dem BDCA-4-Kit vorgegangen. BDCA-4 ist ein Oberflächenmolekül, das vor allem auf plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert wird. Die PBMCs wurden mit eisenhaltigen Mikropartikeln, an die ein BDCA-4-Antikörper gebunden war (BDCA-4-Mikropartikel), sowie mit einem FC-Rezeptor-blockierenden Agens, 20 Minuten inkubiert. (Das FC-Rezeptor blockierende Agens diente dazu unspezifische Bindungen des Antikörpers an FC-Rezeptoren zu verhindern). Die Zellsuspension wurde auf eine Säule (LS-Säule, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Bettvolumen: 3 ml) aufgebracht, die von einem Magnetblock umgeben wurde. Die Zellen, an die die BDCA-4-Mikropartikel gebunden hatten, verblieben aufgrund der magnetischen Anziehungskräfte in der Säule. Die ungebundenen Zellen passierten die Säule. Die Säule wurde anschließend aus dem Magnetblock entfernt. Die in der Säule verbliebene BDCA-4-positive Zellfraktion konnte nun, aufgrund der fehlenden magnetischen Wechselwirkung, mit dem MACS-Puffer aus der Säule gespült werden. Um eine höhere Reinheit zu erhalten, wurde die Zellfraktion nochmals über eine Säule mit kleinerem Bettvolumen (MS-Säule, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Bettvolumen: 1 ml) aufgetrennt. Für alle Isolations-, Inkubations- und Waschschrift wurde ein spezieller Puffer (MACS-Puffer) verwendet, der sich wie folgt zusammensetzte: PBS (PAA Laboratories, Linz, Österreich) 0,5 % humanes Serumalbumin (Kabi 20 %, Pharmacia Upjohn GmbH, Erlangen) und 2mM EDTA (Ethylendiaminotetraessigsäure, Sigma, München), pH 7,4. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in Kulturmedium (siehe Kapitel 2.2.3) aufgenommen. Die Viabilität der Zellen wurde durch Ausschluss der Trypanblau-gefärbten (Sigma, München) Zellen ermittelt und betrug 95 %. Die Reinheit der isolierten Zellpopulation wurde durchflusszytometrisch ermittelt (siehe Kapitel 2.2.4) und lag je nach Spender zwischen 70 und 100 %. Alle Experimente und Isolationsschrift wurden unter sterilen Bedingun-

gen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom (LaminAir HB 2448, Heraeus, München) durchgeführt.

### 2.3.2 Kultur plasmazytoider dendritischer Zellen

Die isolierten plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDCs) wurden in 96-*well*-Zellkulturplatten (Costar Inc., Corning, NY, USA) in einer Konzentration von 250 000 Zellen/ml (Endvolumen/*Well*: 200  $\mu$ l) kultiviert. Das Kulturmedium setzte sich aus RPMI-Medium (PAA Laboratories, Linz, Österreich) mit einem Zusatz von 8 % Hitze inaktiviertem humanem Serum (A/B-Serum, BioWhittaker, Walkersville, MD, USA), 1,5 mM L-Glutamin (GibcoBRL, Paisley, Großbritannien), 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin (Sigma, München) zusammen. Die PDCs wurden je nach Versuchsbedingung in der Gegenwart verschiedener Stimuli für 48 Stunden im Brutschrank (Heraeus 1384, München) kultiviert. Anschließend wurde der zellfreie Überstand zur Detektion der Zytokinkonzentration (siehe Kapitel 2.2.5) abgenommen. Die Zellen wurden geerntet und die Expression der Oberflächenmoleküle wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe Kapitel 2.2.4). Bei Stimulationsversuchen mit CpG-ODN wurden diese in einer Konzentration von 6  $\mu$ g/ml eingesetzt. Diese Konzentration war zuvor als optimal zur Stimulation plasmazytoider dendritischer Zellen ermittelt worden [Krug 2001a].

### 2.3.3 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Analyse der Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Zellen mittels eines optischen Messsystems. Die Analyse des Streulichtsignals gibt Aufschluss über die Größe und Granularität der Zellen. Die Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen kann durch die Verwendung von Antikörpern, an die Fluorochrome gebunden sind, analysiert werden. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden an einem FACS-CALIBUR<sup>®</sup> Gerät (Pharmingen/Becton Dickinson, Heidelberg, BRD) durchgeführt. Das Durchflusszytometer ist mit zwei verschiedenen Lasern ausgestattet, die monochromatisches Licht bestimmter Wellenlänge emittieren und somit die benutzten Fluo-

rochrome zur Fluoreszenz anregen. Ein luftgekühlter Argonlaser emittiert monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm und ein Diodenlaser emittiert monochromatisches Licht der Wellenlänge 635 nm. Die von den angeregten Farbstoffen emittierten Fluoreszenzen können durch Bandpassfilter in maximal vier Farben aufgetrennt werden. Als Fluorochrome wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (Bandpassfilter 530 nm), Phycoerythrin (PE) (Bandpassfilter 585 nm), Allophycocyanin (APC) (Bandpassfilter 661 nm) und Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) (Bandpassfilter 670 nm) verwendet.

Die Bestimmung der Reinheit von plasmazytoiden dendritischen Zellen nach Isolation erfolgte durch Detektion mit Fluorochrom markierten Antikörpern gegen CD123, Lineage-Cocktail-1, HLA-DR (HLADR = *Human leukocyte antigen DR*; MHC II) (alle Pharmingen/Becton Dickinson, Heidelberg, BRD) und BDCA-2 (Miltenyi Biotech). Der Lineage-Cocktail-1 besteht aus einer Mischung von CD3-, CD14-, CD16-, CD19-, CD20- und CD56-Antikörpern. Plasmazytoide dendritische Zellen sind als CD123-positive, Lineage-Cocktail-1-negative, HLA-DR-positive und BDCA-2-positive Zellen definiert und lassen sich somit klar von den übrigen mononukleären Zellen abgrenzen. Zur Analyse der Aktivierung plasmazytoider dendritischer Zellen nach 48-stündiger Kultur, wurde die Expression der Oberflächenmoleküle HLA-DR, CD80, CD86 und CD40 mit Fluorochrom-markierten Antikörpern detektiert (Pharmingen/Becton Dickinson). Die Inkubation mit den Fluorochrom markierten Antikörpern und die durchflusszytometrische Analyse wurden nach dem Protokoll von Hartmann et al. [Hartmann 1998] durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm CellQuest 4.0 (Pharmingen/Becton Dickinson) ausgewertet.

### 2.3.4 Quantifizierung der Zytokinsekretion

Die Quantifizierung der Zytokine IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und TNF- $\alpha$  (TNF = Tumor Nekrose Faktor) sowie des Chemokins IL-8 erfolgte mittels ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay* = enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) im zellfreien Überstand. Folgende ELISAs wurden verwendet: Zur Detektion von IFN- $\alpha$  wurde ein ELISA von Bender MedSystems (BMS216MST, Wien, Österreich), mit einem Detektionsbereich von 8-500 pg/ml eingesetzt. Dieser ELISA detektiert vor allem die IFN- $\alpha$ -Isoformen IFN- $\alpha$ 2a und IFN- $\alpha$ 2b nicht jedoch IFN- $\alpha$ B and IFN- $\alpha$ F. Zur Quantifizierung von



IFN- $\beta$  wurde ein IFN- $\beta$  ELISA von PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, NJ, USA) verwendet. Der Detektionsbereich liegt zwischen 250 und 10000 pg/ml. Zur quantitativen Bestimmung von IL-8 und TNF- $\alpha$  dienten der humane Opteia<sup>®</sup> IL-8-ELISA (Detektionsbereich: 3-200 pg/ml) und der humane Opteia<sup>®</sup> TNF- $\alpha$ -ELISA (Detektionsbereich: 8-500 pg/ml) beide von Pharmingen/Becton Dickinson. Die ELISAs wurden den beigelegten Protokollen entsprechend durchgeführt. Die spektrometrische Gehaltsbestimmung erfolgte mit dem ELISA-Reader MRX (Dynatech Laboratories, San Diego, USA).

### 2.3.5 Versuche mit Antikörpern

#### Typ-I-IFN-Rezeptor-Antikörper:

Untersucht wurde der Einfluss eines blockierenden Typ-I-IFN-Rezeptor Antikörpers auf die CpG-ODN-vermittelte Aktivierung der PDC. Bei dem verwendeten Antikörper handelte es sich um einen monoklonalen murinen Antikörper gegen die humane IFN- $\alpha$ -Rezeptor Kette 2 (# 21385-1, PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ, USA). Als Kontrollantikörper diente ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper der ebenfalls gegen die humane IFN- $\alpha$ -Rezeptor Kette 2 gerichtet war, jedoch keine blockierende Aktivität besaß (# 31385-1, PBL Biomedical Laboratories). Die Natriumazid-freie Antikörperlösung wurde zusammen mit den CpG-ODN zu den PDCs gegeben. Die Konzentration des Antikörpers betrug 20  $\mu$ g/ml pro *Well*. Diese Konzentration war zuvor als optimale Hemmkonzentration für die Blockierung der IFN- $\alpha$ -Wirkung auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen ermittelt worden [Rothenfusser 2001]. Die Aktivierung der PDC und deren Zytokinproduktion wurden, wie im Kapitel 2.3.3 und 2.3.4 beschrieben, analysiert.

#### BDCA-2-Antikörper:

BDCA-2 ist ein Oberflächenmolekül, das vor allem auf PDCs exprimiert wird. Bei dem verwendeten BDCA-2-Antikörper handelte es sich um einen aktivierenden Antikörper, der ein Signal vermittelt [Dzionic 2001; Kerkmann 2003]. Um den Einfluss des BDCA-2-Antikörpers (Miltenyi Biotech) auf die CpG-ODN-vermittelte Aktivierung der PDCs zu untersuchen, wurde wie folgt vorgegangen: PDCs wurden wie im Kapitel 2.2.2 beschrieben isoliert. Vor der Zugabe des CpG-ODN wurden die Zellen 20 Minuten mit

dem BDCA-2-Antikörper inkubiert und anschließend gewaschen (siehe Kapitel 4.3.1). Zur Bestimmung der optimalen Hemmkonzentration des BDCA-2-Antikörpers wurde eine Konzentrationsreihe erstellt. Die Konzentration 2,5 µg/ml erwies sich als optimal [Kerkmann 2003]. Als Kontrollantikörper diente ein gegen das nicht auf PDCs exprimierte Oberflächenmolekül BDCA-1 gerichteter Antikörper.

### 2.3.6 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden als arithmetische Mittel angegeben, und die Streuung wurde als Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *Standard error of mean*) dargestellt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde der zweiseitige gepaarte Student-t-Test angewendet. Lag keine Normal-Verteilung der Stichproben vor, so wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$  angenommen. Statistische Berechnungen wurden mit dem Programm Stat-View 4.5 (Abacus Concepts, CA, USA) erstellt.

## 2.4 Versuche mit CpG-Oligonukleotid beladenen Nanopartikeln

### 2.4.1 Herstellung von CpG-Oligonukleotid beladenen Nanopartikeln

Zwei verschiedene Arten von Nanopartikeln wurden verwendet: Protikel und Polystyrolnanopartikel.

#### Protikel:

M. Junghans [Junghans 2000] entdeckte, dass Protamin einzelsträngige Oligonukleotide kompaktiert und zu Nanopartikeln aggregiert, die als Protikel bezeichnet werden. Protikel bilden sich spontan. Ihre Größe ist abhängig von dem Massenverhältnis Protamin zu ODN sowie von der Inkubationszeit. Protikel sind Nanosphärulen, die aus einem homogenen Geflecht von ODN-Protaminaggregaten bestehen (siehe Abb. 2.2). In Zusammenarbeit mit dem Institut für pharmazeutische Technologie (Prof. A. Zimmer) der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt, wurde ein Protokoll zur Herstellung von

CpG-Protikeln erarbeitet. Ziel war es, Protikel mit kleiner Größe, hoher Stabilität, einheitlicher Größenverteilung und einem hohen Anteil an negativ geladenen Oligonukleotiden an der Oberfläche zu erhalten. Da die Anwesenheit von Ionen die Protikelbildung stört, wurden die Oligonukleotide und das Protamin (Sigma, München) in Wasser für Injektionszwecke gelöst. Zur Herstellung der Protikel wurden die CpG-ODN-Lösung und die wässrige Protaminlösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf tube, 1ml, Eppendorf AG, Hamburg) zusammenpipettiert. Anschließend wurde die Lösung geschüttelt und mehrere Minuten ruhen gelassen. Für ein Verhältnis ODN zu Protamin von 1:2 wurden 30 µg ODN, 60 µg Protamin und 1000 µl Wasser für Injektionszwecke gemischt. Verschiedene Inkubationszeiten und Verhältnisse von ODN zu Protamin wurden untersucht: CpG-B: 1:3 (5 min.); 1:2,5 (5 min.); 1:2 (5, 10 und 20 min); CpG-A: 1:2 (5, 10 und 20 min).

Die Messung der Größe, der Polydispersität und des Zetapotentials der Nanopartikellösung wurde an einem Zetasizer (Malvern Zetasizer 3000HSA, Malvern GmbH, Herrenberg) vorgenommen. Dieser ermöglicht die Messung von Partikelgrößen nach dem Prinzip der Photonenkorrelationsspektroskopie und die Messung des Zetapotentials nach dem Prinzip der Mikroelektrophorese (Laser-Doppler Anemometrie).

**Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)**, auch dynamische Laserstreulichtanalyse genannt, ermöglicht Partikelgrößenmessungen im Submikronbereich ( $<1 \mu\text{m}$ ). Partikel, die in einer Flüssigkeit dispergiert sind, unterliegen einer ungeordneten zufälligen Bewegung, der Brownschen Molekularbewegung. Die PCS misst die Geschwindigkeit dieser Bewegung. Bei der Messung wird ein kohärenter, monochromatischer Laserstrahl durch die Probe geschickt. Gemessen wird die Streulichtintensität zu verschiedenen Zeitpunkten. Aus der zeitabhängigen Änderung der Streulichtintensität kann unter Zuhilfenahme der Mie-Theorie die Geschwindigkeit der Bewegung der in Lösung befindlichen Partikel korreliert werden. Anhand der Stokes-Einsteinschen-Gleichung wird die Geschwindigkeit der Bewegung in Beziehung zu der Größe gesetzt. Der Polydispersitätsindex entspricht der Varianz der Größenverteilung und ist ein dimensionsloses Maß für die Verteilungsbreite. Je kleiner der Polydispersitätsindex ist, umso mehr Partikel mit einheitlicher Größe liegen im System vor. Beträgt der Polydispersitätsindex  $<1$  liegt eine homogene Größenverteilung vor.

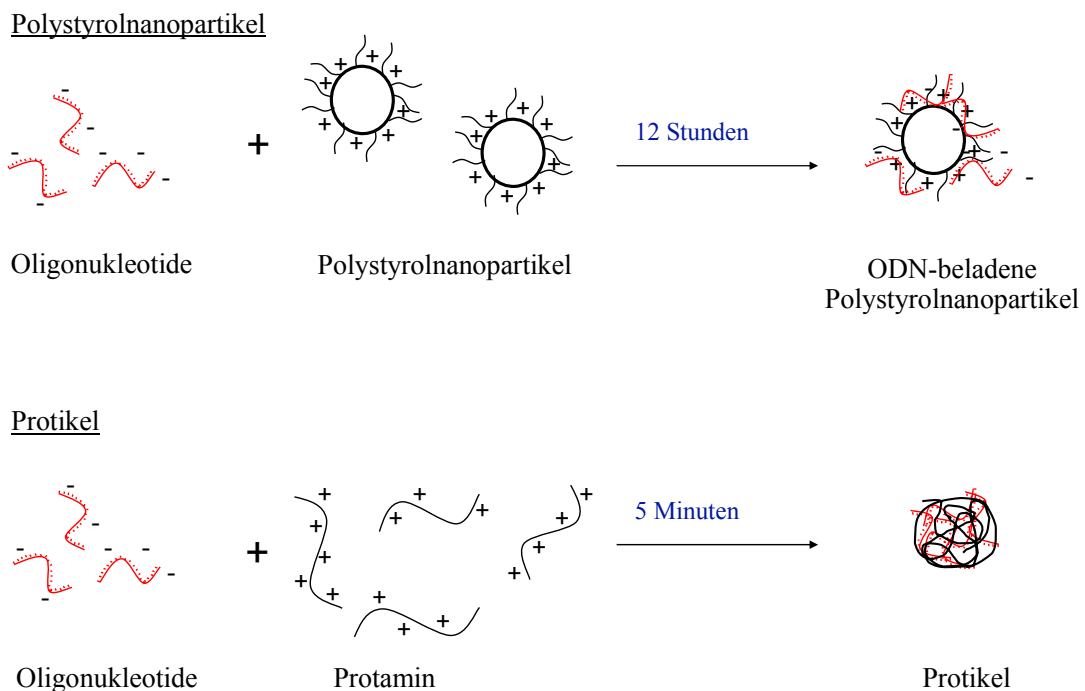
Das **Zetapotential** ist ein Maß für die physikalische Stabilität disperser Systeme. Die Stabilität disperser Systeme hängt von den Wechselwirkungen zwischen den sich in Lösung befindlichen Teilchen ab. Besteht eine große Affinität zwischen den Teilchen, führt das zu Agglomeration und Sedimentation und letztendlich zu der Instabilität des Systems. Geladene Partikel ziehen Ionen entgegengesetzter Ladung an. Ionen nahe an der Partikeloberfläche werden stärker gebunden, die weiter entfernten Ionen bilden eine diffuse Schicht. Die Grenzschicht des Bereiches, der mit dem Partikel eine feste Einheit bildet, wird als Scherebene bezeichnet. Das Potential an dieser Scherebene ist als Zetapotential bekannt und kann anschaulich mit der aktiven Ladung des Partikels verglichen werden. Je höher das Zetapotential, desto stabiler das disperse System (Einheit mV). Der Malvern Zetasizer nutzt zur Bestimmung des Zetapotentials die Mikroelektrophorese. Aus der Messung von Richtung und Geschwindigkeit eines Teilchens im elektrischen Feld lässt sich anhand der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung das Zetapotential berechnen.

In früheren Studien [Junghans 2000] konnte gezeigt werden, dass bei der Protikelbildung 80-90 % der Oligonukleotide gebunden werden. Aufgrund des Massenwirkungsgesetzes liegt ein gewisser Teil an Oligonukleotiden immer ungebunden vor. Daher wurde auf Gehaltsbestimmungen von gebundenem Oligonukleotid verzichtet.

### Polystyrolnanopartikel:

Die verwendeten Polystyrolnanopartikel wurden am Institut für organische Chemie (Prof. E. Bayer) der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, nach dem Verfahren der Emulsions-Polymerisation [Fritz 1997] hergestellt. Die Verwendung des kationischen Polymerisationsinitiators AIBI 2,2'-Azobis(2-(2-imidazolin-2-yl)propan)dihydrochlorid führte zu einer positiven Oberflächenladung der Nanopartikel. Um eine sterische Stabilisierung der Nanopartikel (Stealth-Technologie) zu erreichen, wurden hydrophile Poloxamer-338-Moleküle an die Nanopartikeloberfläche gebunden. Die verwendeten Nanopartikel hatten eine Größe von 180 nm und wurden in einem Phosphatpuffer bestehend aus 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Darmstadt), pH 7, suspendiert. In diesem Phosphatpuffer wurden auch die lyophilisierten Oligonukleotide aufgelöst. Die maximale Beladungskapazität der Nanopartikel beträgt 3  $\mu\text{mol}$  ODN pro gramm Nanopartikel. Diese Angabe bezieht sich auf ein 15-mer ODN (mit 15 Basen).

Zur Beladung der Nanopartikel wurden die Nanopartikelsuspension und die entsprechende Menge an ODN-Lösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammenpipetiert. Anschließend wurde geschüttelt und bei 25°C für 12 Stunden inkubiert. Danach wurde die ODN-Nanopartikel-Suspension bei 20400 g, 45 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet, bestehend aus Nanopartikeln, wurde in einem definierten Volumen des Phosphatpuffers aufgenommen. Um den Gehalt an ungebundenem Oligonukleotid im Überstand bestimmen zu können, wurde dieser nochmals zentrifugiert, um bei der Gehaltsbestimmung störende Nanopartikel zu eliminieren. Die Quantifizierung des ungebundenen Oligonukleotides im Überstand wurde photometrisch durchgeführt. Gemessen wurde die Absorption der ODN-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Nach den Regeln des Lambert-Beerschen Gesetzes kann anhand der gemessenen Absorption die Konzentration der ODN-Lösung errechnet werden. Die Bestimmung der Konzentration des ungebundenen Oligonukleotides im Nanopartikel-Überstand ermöglichte die Berechnung der Menge an Oligonukleotid, die an Nanopartikel gebunden wurde.



**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung der Herstellung von ODN-beladenen Polystyrolnanopartikeln und Protikeln.

### 2.4.2 Zellkultur mit CpG-Oligonukleotid beladenen Nanopartikeln

PBMCs und PDCs wurden wie im Kapitel 2.2.2 beschrieben isoliert. Die CpG-ODN-beladenen Nanopartikel wurden so eingesetzt, dass die ODN-Konzentration pro *Well* 3 µg/ml betrug. Für die ungebundenen CpG-ODNs wurde die gleiche Endkonzentration gewählt. Als Kontrolle dienten mit Kontroll-ODN beladene Nanopartikel. Ein Vergleich mit den unbeladenen Polystyrolnanopartikeln wäre nicht sinnvoll, da diese positiv geladenen Partikel toxisch auf die Zelle wirken. Im Fall der Partikel gibt es keine unbeladenen Partikel, da ohne anionischen Reaktionspartner keine Nanopartikelbildung stattfindet. Untersucht wurde die Wirkung der Nanopartikel auf PBMCs und auf isolierte PDCs. Bei den Experimenten mit PBMCs wurden die Zellen in einer Konzentration von 2 Millionen Zellen/ml in 96-*well*-Platten angesetzt. Aktivierung und Zytokinsekretion wurde ebenso wie bei den PDCs nach 48 Stunden gemessen. Als Medium wurde RPMI mit einem Zusatz von 10 % Hitze-inaktiviertem fetalen Kälberserum (= FCS, Invitrogen, Linz, Österreich), 1,5 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gewählt.

### 2.4.3 Aufnahme durch plasmazytoide dendritische Zellen

FITC-markiertes CpG-A und CpG-B wurde von der Firma Metabion bezogen. Die Aufnahme von Nanopartikeln, die mit FITC-markierten CpG-ODN (kurz FITC-ODN) beladen waren, wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Hierzu wurden PDCs mit FITC-ODN oder mit Nanopartikeln, die mit FITC-ODN beladen waren, 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle dienten PDCs, die über den gleichen Zeitraum bei 4°C inkubiert wurden. Bei 4°C findet keine Endozytose statt. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal gewaschen. Anschließend wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals im Durchflusszytometer analysiert.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Strukturanalyse von CpG-Oligonukleotiden

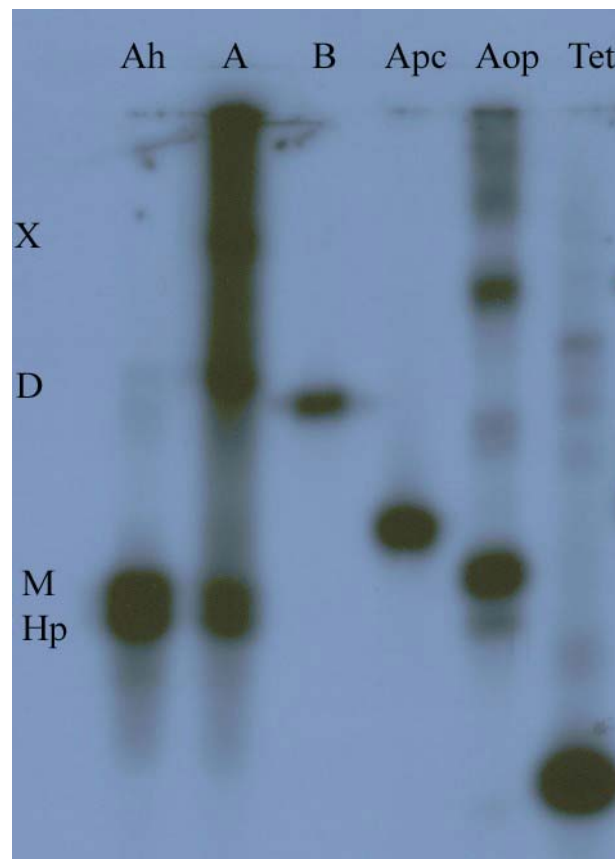
Einzelsträngige kurze DNA-Moleküle verfügen je nach Sequenz über die Fähigkeit, intra- und intermolekulare Bindungen einzugehen. Die Sequenz von CpG-A weist im Gegensatz zu CpG-B drei reaktive Zentren auf, die die Bildung von inter- und intramolekularen Bindungen begünstigen können: ein Palindrom und zwei Poly-G-Motive am 3' und 5' Ende. Mittels Rasterkraftmikroskopie und Gelelektrophorese sollte untersucht werden, inwiefern sich CpG-A und CpG-B bezüglich der Fähigkeit unterscheiden, höhermolekulare Komplexe zu bilden.

#### 3.1.1 Gelelektrophorese

Die native Polyacrylamidgelelektrophorese eignet sich zur Untersuchung der Komplexbildung von einzelsträngigen Oligonukleotiden. Verglichen wurde das Laufverhalten von CpG-A und CpG-B im nativen Gel mit dem der folgenden Oligonukleotide: CpG-Apc, CpG-Aop und Tet1.5. Alle Oligonukleotide wurden in PBS gelöst, um die Komplexbildung unter physiologischen Salzkonzentrationen zu untersuchen. In der Abbildung 3.1 ist ein natives Gel zu sehen, in dem das Laufverhalten der oben genannten Oligonukleotide analysiert wurde.

Je kleiner das Oligonukleotid, desto schneller wandert es im nativen Gel. Einzelne ODN-Moleküle wandern demnach schneller als Komplexe aus mehreren ODN-Molekülen. CpG-B zeigt ein einheitliches Laufverhalten im nativen Polyacrylamidgel. Es ist nur eine Bande (B) sichtbar, die wahrscheinlich dem Monomer entspricht. CpG-A hingegen lässt sich in mehrere Banden (A) auftrennen. Die verschiedenen Banden können unterschiedlichen Komplexen aus mehreren CpG-A-Molekülen zugeordnet werden. Die am schnellsten wandernde Bande trennt sich in zwei Banden auf: HP (=hairpin) und M (= Monomer), die verschiedenen Konformationen des Monomers von CpG-A zugeordnet werden können. Das Dimer von CpG-A wandert wahrscheinlich auf der

Höhe des Buchstabens D. Die langsamer wandernden Banden (X) sind nicht eindeutig zu differenzieren und entsprechen Komplexen aus mehreren CpG-A-Molekülen. Um die Stabilität der von CpG-A gebildeten Komplexe zu untersuchen, wurde CpG-A 20 Minuten bei 96°C gekocht, auf Eis gekühlt und auf das Gel geladen (Ah). Dieser Kochvorgang führte zu einem reduzierten Bandenspektrum. Es sind nur noch zwei schnell wandernde Banden auf dem Gel zu sehen. Dieser Befund deutet auf eine Aufspaltung der höhermolekularen Komplexe von CpG-A durch den Kochvorgang hin.



**Abb. 3.1:** Native Polyacrylamidgelelektrophorese  $^{32}\text{P}$ -markierter Oligonukleotide: Ah: CpG-A nach 20-minütigem Erhitzen bei 96°C; A: CpG-A; B: CpG-B; Apc: CpG-Apc; Aop: CpG-Aop; Tet: ODN Tet1.5.

Das Kontroll-ODN CpG-Apc weist im Vergleich zu CpG-A Poly-C-Motive statt Poly-G-Motive auf. Auf dem Gel zeigt dieses Oligonukleotid ein einheitliches Laufverhalten (Apc). Es ist nur eine Bande zu sehen. Durch den Einbau von vier *Mismatches* (nicht-komplementäre Basen) in die zentrale Palindromsequenz von CpG-A entstand das Kontroll-ODN CpG-Aop. Dieses Oligonukleotid weist verglichen mit CpG-A ein verringertes Bandenspektrum auf, das sich aus 6-7 Banden zusammensetzt (Aop). Das ODN Tet



1.5 verfügt über die Fähigkeit, in Gegenwart hoher Konzentrationen von Kalium und Magnesium höhermolekulare Komplexe zu bilden, die als *G-wires* bezeichnet werden [Marsh 1995]. Unter physiologischen Salzkonzentrationen, die hier verwendet wurden, zeigt das ODN Tet 1.5 jedoch ein vorwiegend einheitliches Laufverhalten (Tet). Neben einer Hauptbande, die wahrscheinlich dem Monomer entspricht, sind mehrere schwache Banden zu sehen.



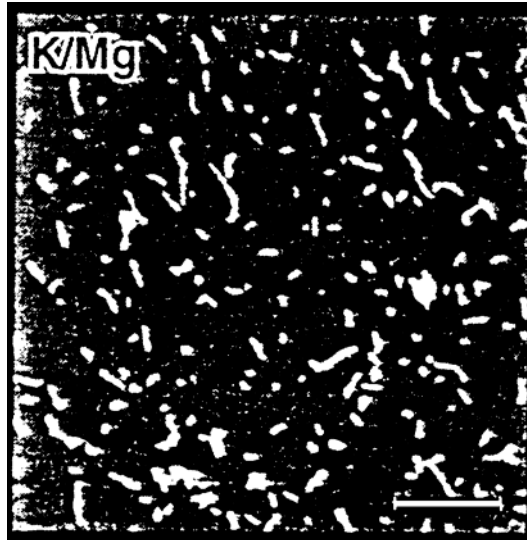
**Abb 3.2:** Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese  $^{32}\text{P}$ -markierter Oligonukleotide: A: CpG-A, B: CpG-B, rechts der Oligonukleotid-Größen-Marker.

Bei der denaturierenden Gelelektrophorese wird dem Gel Harnstoff zugesetzt, der intra- und intermolekulare Sekundärstrukturen auflöst. Somit hängt die elektrische Mobilität der einzelsträngigen DNA im denaturierenden Gel nur von ihrem Molekulargewicht ab. Der Vergleich mit einem Oligonukleotid-Größen-Marker ermöglicht die Bestimmung der Länge (Anzahl der Basen) der verwendeten Oligonukleotide. Wie in Abbildung 3.2 zu sehen, laufen die beiden Oligonukleotide CpG-A und CpG-B entsprechend ihrer Basenzahl (CpG-B 24 Basen, CpG-A 20 Basen). Die von CpG-A-gebildeten höhermolekularen Komplexe konnten durch die denaturierenden Bedingungen nicht aufgelöst werden

#### 3.1.2 Rasterkraftmikroskopie

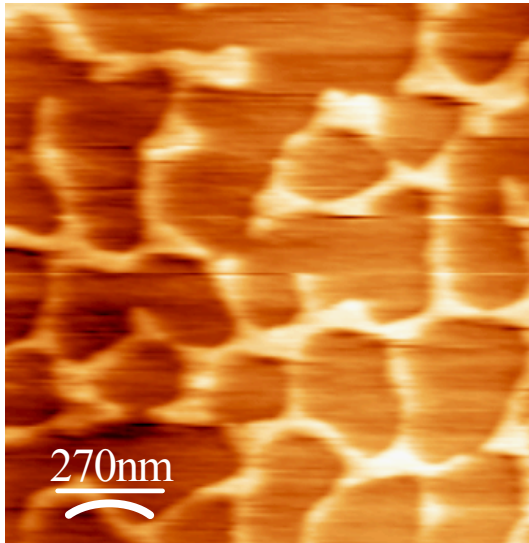
Da die Gelelektrophorese keinen Aufschluss über die Form und das Aussehen der von CpG-A gebildeten Komplexe gibt, wurde eine bildgebende Methodik zur weiteren Untersuchung eingesetzt. Die Rasterkraftmikroskopie ist eine hochauflösende Mikroskopie und ermöglicht die bildliche Darstellung von Proben mit einer Auflösung bis zu 0,1 nm. Die Etablierung eines optimalen Protokolls für die Probenpräparation ist der wichtigste und schwierigste Punkt bei Arbeiten mit dem Rasterkraftmikroskop. Es zeigte sich, dass insbesondere das Entfernen jeglicher Salzreste durch mehrmaliges Spülen mit Wasser für Injektionszwecke sowie das vollkommene Trocknen der Probe sehr wichtig sind. Feuchtigkeitsreste können die Messung stören. Letztendlich erwies sich das anfängliche Trocknen unter dem Luftstrom der Werkbank und das anschließende Trocknen mit Stickstoffgas als optimal.

Die ersten Messungen wurden im Kontakt-Modus durchgeführt und orientierten sich an dem Protokoll von Henderson et al. [Marsh 1995]. Hierzu wurden die Oligonukleotide in *G-wire*-Puffer gelöst, der hohe Konzentrationen von  $K^+$  und  $Mg^{2+}$  aufweist und die G-Tetradenbildung begünstigt. Wie in der Abbildung 3.4A zu sehen, bildet CpG-A bei einer Konzentration von 250  $\mu\text{g/ml}$  und in Gegenwart hoher Konzentrationen an  $K^+$  und  $Mg^{2+}$  netzartige Strukturen, die vergleichbar sind mit den von Henderson beobachteten *G-wire*-Strukturen des ODNs Tet 1.5 (Abb.3.3).

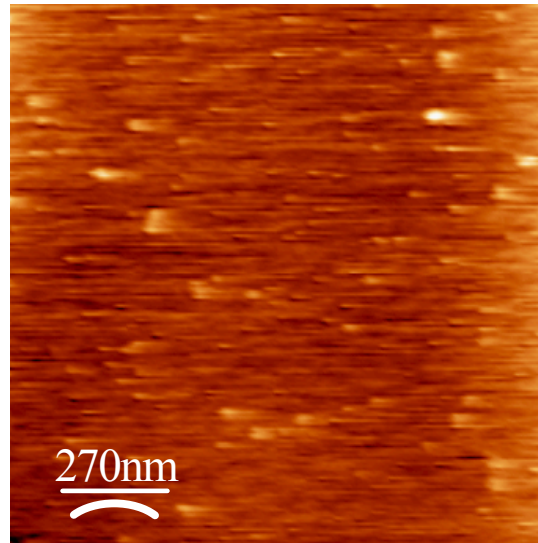


**Abb.3.3:** AFM-Aufnahme von ODN Tet 1.5 in *G-wire*-Puffer,  $c=250 \mu\text{g/ml}$ , Klopf-Modus, Maßstab 250 nm [Marsh 1995].

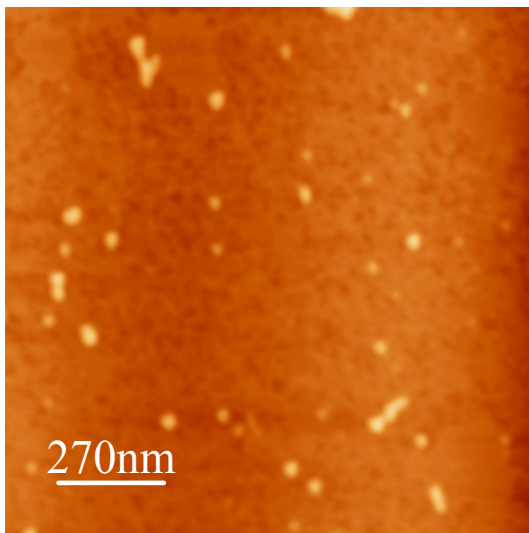
Die Recherche der neueren Literatur ergab, dass die von Henderson verwendete ODN-Konzentration sehr hoch ist und in neueren Publikationen niedrigere Konzentrationen verwendet werden [Hansma 1996]. Bei derart hohen Konzentrationen, wie Henderson sie wählte, kann unspezifische Aggregation auftreten. Eine Reduktion der Konzentration von CpG-A auf  $6 \mu\text{g/ml}$  führte zu der Bildung der in Abbildung 3.4B sichtbaren Partikel und länglichen Strukturen.



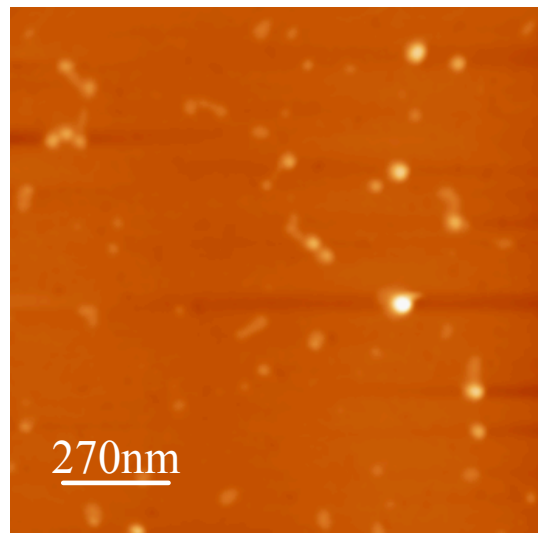
**A**  $c=250 \mu\text{g/ml}$  in *G-wire*-Puffer, Kontakt-Modus



**B**  $c=6 \mu\text{g/ml}$  in *G-wire*-Puffer, Kontakt-Modus



**C**  $c=6 \mu\text{g/ml}$  in *G-wire*-Puffer, Klopf-Modus



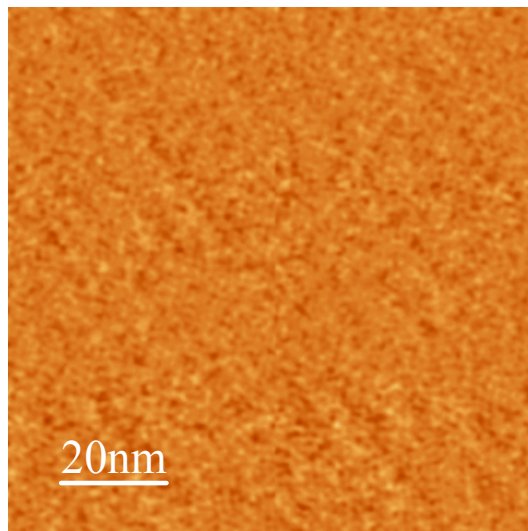
**D**  $c=6 \mu\text{g/ml}$  in PBS, Klopf-Modus

**Abb.3.4:** AFM-Bilder von CpG-A: Größenbereich:  $1,4 \times 1,4 \mu\text{m}$ ,  
**A:** Messung im Kontakt-Modus, ODN-Konz.  $c=250 \mu\text{g/ml}$ , gelöst in *G-wire*-Puffer,  
**B:** Messung im Kontakt-Modus, ODN-Konz.  $c=6 \mu\text{g/ml}$ , gelöst in *G-wire*-Puffer,  
**C:** Messung im Klopf-Modus, ODN-Konz.  $c=6 \mu\text{g/ml}$ , gelöst in *G-wire*-Puffer,  
**D:** Messung im Klopf-Modus, ODN-Konz.  $c=6 \mu\text{g/ml}$ , gelöst in PBS.

Die Messungen im Kontakt-Modus ergaben keine qualitativ hochwertigen Bilder. Ein Problem stellte insbesondere das Verschieben der Probe und die schnelle Kontamination der Spitze dar. Der Klopf-Modus weist im Vergleich zum Kontakt-Modus den Vorteil auf, dass die Probe bei der Messung nicht verschoben und beschädigt wird. Die Messung der gleichen Probe im Klopf-Modus führte zu dem in Abbildung 3.4C dargestellten Bild.

Der von Henderson verwendete *G-wire*-Puffer enthält hohe Konzentrationen an  $K^+$ - und  $Mg^{2+}$ -Ionen, die nicht den physiologischen Bedingungen entsprechen. Um zu untersuchen, ob die Komplexbildung von CpG-A auch in Lösungen mit physiologischen Salzkonzentrationen stattfindet, wurden die Oligonukleotide in PBS gelöst. Wie in Abbildung 3.4D zu sehen, bildet CpG-A auch unter physiologischen Salzbedingungen heterogene partikuläre Strukturen. Die Höhe der Partikel lag zwischen 3 und 10 nm ( $n=9$ ) und der Durchmesser der runden Partikel belief sich auf 40-60 nm ( $n=8$ ). Die durchschnittliche Länge der ovalen Strukturen betrug 100 nm. Es gelang nicht, die Komplexbildung der Oligonukleotide in RPMI-Medium zu untersuchen. Die Proben konnten nicht vollkommen getrocknet werden und waren von einer gelartigen Schicht überzogen.

CpG-B bildet im Gegensatz zu CpG-A keine Komplexe. Weder in der hohen, noch in der niedrigen Konzentration konnten CpG-B-basierte Komplexe mit dem AFM detektiert werden. In Abbildung 3.5 ist ein AFM-Bild von CpG-B in PBS ( $c=6\mu\text{g/ml}$ ) zu sehen. Ausgehend von einem ersten Bild mit den Seitenlängen  $1,4 \times 1,4 \mu\text{m}$ , auf dem keine Komplexe sichtbar waren, wurde der Rasterbereich immer weiter reduziert bis zu einer Seitenlänge von  $100 \times 100 \text{ nm}$ .



**Abb 3.5:** AFM-Bild von CpG-B:  
Größenbereich:  $100 \times 100 \text{ nm}$ , Messung im Klopf-Modus, ODN-Konz.  $c=6 \mu\text{g/ml}$ , gelöst in PBS.

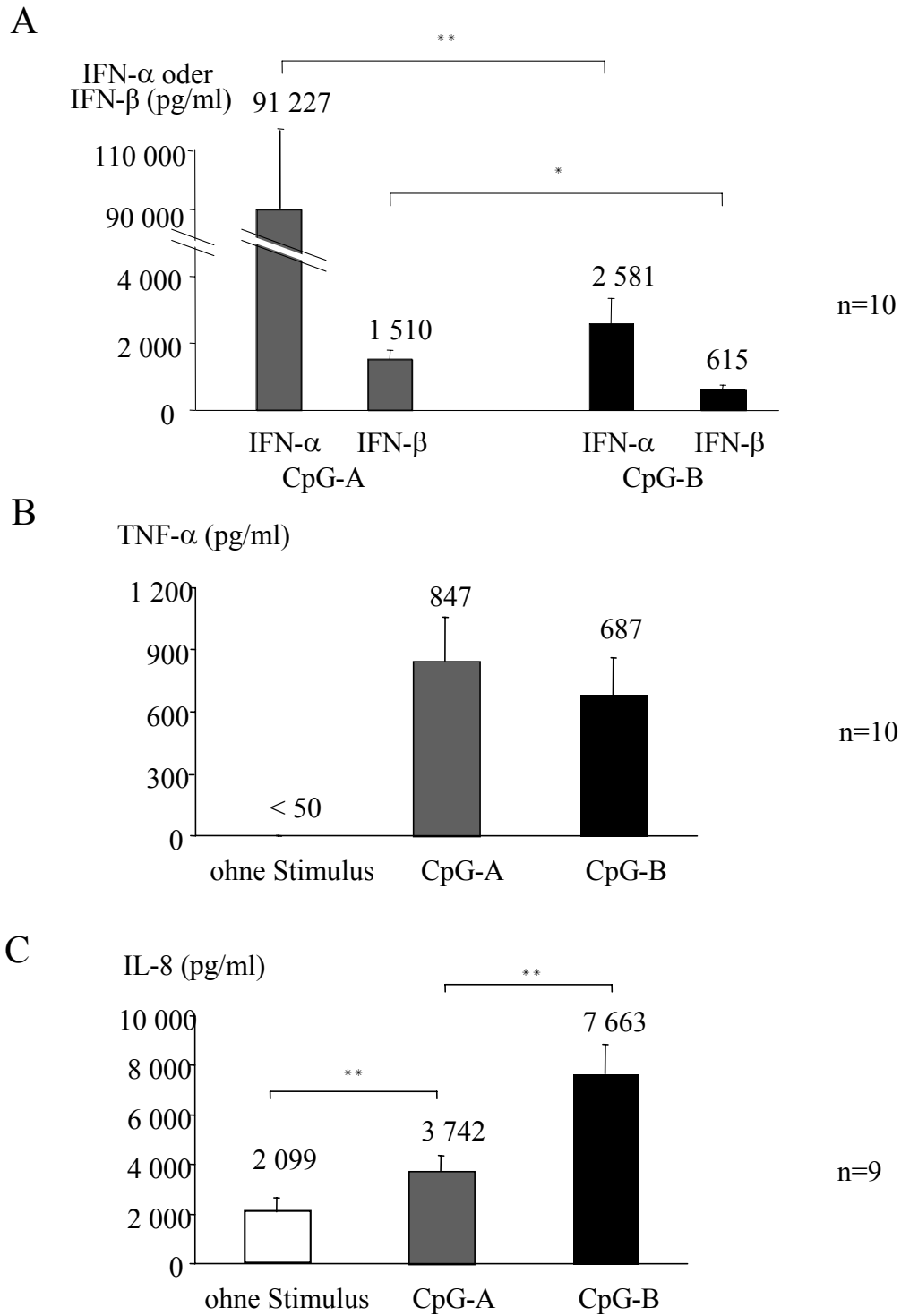
Dieses „Zoomen“ ermöglicht eine immer höhere Auflösung und die Detektion von sehr kleinen Strukturen. Auch in diesem kleinen Größenbereich waren keine partikelartigen Strukturen sichtbar. Die durchschnittliche Höhe betrug 1,2 nm und entspricht einer einschichtigen Lage von CpG-B auf dem Glimmer.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass CpG-A, nicht jedoch CpG-B es vermag, unter physiologischen Salzkonzentrationen multimolekulare Komplexe zu bilden, die mit dem AFM sichtbar gemacht werden können. Diese multimolekularen Komplexe sind heterogen und weisen einen partikulären Charakter auf mit einem Durchmesser zwischen 40 und 60 nm. Die Fähigkeit von CpG-A, diese Komplexe zu bilden, scheint auf der Koexistenz von einer zentralen Palindromsequenz und Poly-G-Motiven zu beruhen. Kontroll-ODN, denen eines dieser beiden Strukturmerkmale fehlt, zeigen eine reduzierte Komplexbildung.

## 3.2 Wirkung von CpG-Oligonukleotiden auf plasmazytoide dendritische Zellen

Die beiden Klassen von CpG-Oligonukleotiden unterscheiden sich nicht nur in ihrer Sekundärstruktur, sondern auch in ihren immunstimulatorischen Eigenschaften. Plasmazytoide dendritische Zellen exprimieren den TLR-9-Rezeptor und werden von beiden CpG-ODN Klassen auf unterschiedliche Weise aktiviert. Die Wirkung der beiden Klassen von CpG-Oligonukleotiden auf angereicherte PDCs wurde bereits von A. Krug beschrieben [Krug 2001a]. In ersten Vorversuchen konnten diese Ergebnisse für reine PDCs bestätigt und erweitert werden. Hierzu wurden reine PDCs für 48 Stunden mit CpG-ODN inkubiert. Anschließend wurde die Aktivierung der PDCs sowie die Zytokinproduktion bestimmt.

Wie in Abbildung 3.6A zu sehen, induziert CpG-A extrem hohe Mengen an IFN- $\alpha$  in PDCs im Vergleich zu CpG-B. Bezüglich der Induktion von IFN- $\beta$  erwies sich CpG-A ebenfalls als potenterer Stimulus (Abb.3.6A). Beide Gruppen von CpG-ODN induzieren äquivalent hohe Mengen des antiinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  (Abb. 3.6B). Die Synthese des Chemokins IL-8 wird jedoch stärker durch CpG-B als durch CpG-A gefördert (Abb. 3.6C).



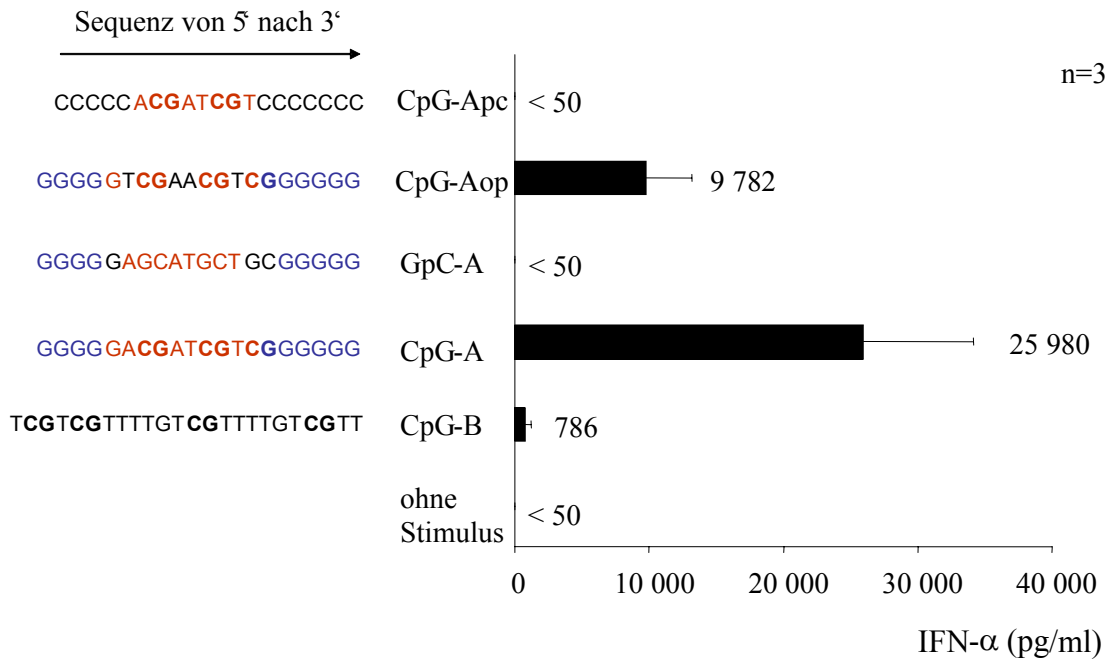
**Abb. 3.6:** CpG-ODN-vermittelte Chemokin- und Zytokinproduktion in PDCs: PDCs (250 000 Zellen/ml) wurden 48 Stunden mit CpG-ODN (c=6 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration von IFN-α, IFN-β (A), TNF-α (B) und IL-8 (C) im Überstand mittels ELISA detektiert.

Die Analyse der Aktivierung der PDC ergab, dass CpG-B die PDC stärker aktiviert als CpG-A, welches sich in einer höheren Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie des Antigen-präsentierenden MHC II-Moleküls manifestierte (Abb. 3.12).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die unterschiedlichen Effekte der beiden CpG-ODN Klassen auf PDCs nicht nur quantitativer, sondern qualitativer Natur sind. CpG-A induziert höhere Mengen an Typ I IFN. CpG-B hingegen führt zu einer stärkeren Aktivierung der Zelle und induziert höhere Mengen an IL-8. Die beiden Klassen von CpG-ODN aktivieren die PDC auf unterschiedliche Art und Weise. Daher ist anzunehmen, dass beide Klassen von CpG-ODN differenzielle Signaltransduktionswege in der PDC aktivieren.

Der markanteste funktionelle Unterschied der beiden CpG-ODN-Klassen bezüglich ihrer Wirkung auf PDCs besteht in der Induktion von IFN- $\alpha$ . CpG-A induziert 35-mal höhere Mengen an IFN- $\alpha$  als CpG-B. Wie zuvor gezeigt, besteht ein weiterer Unterschied zwischen diesen beiden CpG-Klassen in ihrer Fähigkeit, höhermolekulare Komplexe zu bilden. Gegenstand der folgenden Experimente war es, zu klären, ob ein Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung für den Parameter IFN- $\alpha$  besteht. Zuvor wurde die Komplexbildung verschiedener Oligonukleotide mittels Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Nun sollte die Fähigkeit dieser Oligonukleotide, IFN- $\alpha$  zu induzieren, untersucht werden. Hierzu wurden PDCs mit den verschiedenen Oligonukleotiden 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde in den zellfreien Überständen die IFN- $\alpha$ -Produktion gemessen. Der Abbildung 3.7 ist zu entnehmen, dass die Substitution der Poly-G-Motive durch Poly-C-Motive (CpG-Apc) zu einem Verlust der Fähigkeit führt, hohe Mengen an IFN- $\alpha$  zu induzieren. Das Kontroll-ODN CpG-Aop zeigte im Gel eine verminderte Komplexbildung verglichen mit CpG-A. Wie hier zu sehen ist, ist auch dessen IFN- $\alpha$ -induzierende Potenz im Vergleich zu CpG-A reduziert. Dennoch induziert CpG-Aop im Vergleich zu CpG-B hohe Mengen an IFN- $\alpha$ . Ein GC-Kontroll-ODN (GpC-A) zu CpG-A, welches ebenfalls höhermolekulare Komplexe bildet (eigene in dieser Dissertation nicht vorgestellte Daten), induziert kein IFN- $\alpha$  in PDCs. Ebenso ruft das ODN Tet1.5 keine IFN- $\alpha$ -Synthese in PDCs hervor.





**Abb. 3.7:** CpG-ODN-vermittelte IFN- $\alpha$ -Produktion in PDCs: PDCs (250 000 Zellen/ml) wurden 48 Stunden mit CpG-ODN oder Kontroll-ODN ( $c=6\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration von IFN- $\alpha$  im Überstand mittels ELISA detektiert. Links: die Sequenzen der verschiedenen ODN von 5' nach 3'.

Somit bedingen die Poly-G-Motive und das Palindrom von CpG-A einerseits die Ausbildung partikulärer Strukturen durch CpG-A und andererseits deren Fähigkeit, IFN- $\alpha$  zu induzieren. Dies ist ein Indiz dafür, dass für den Parameter IFN- $\alpha$  ein Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung besteht. Um diese Hypothese zu stützen, wurde untersucht, inwiefern die IFN- $\alpha$ -Produktion durch CpG-B verändert werden kann, wenn man diesem CpG-ODN eine partikuläre Struktur verleiht. Hierzu wurden beide Klassen von CpG-ODN an Nanopartikel gebunden und untersucht, ob sich deren Wirkung auf PDCs dadurch verändert.

### 3.3 Wirkung von CpG-Oligonukleotid-beladenen Nanopartikeln

#### 3.3.1 Herstellung von CpG-Oligonukleotid-beladenen Nanopartikeln

Wie bereits in Kapitel 1.5 beschrieben, sind Nanopartikel feste kolloidale Partikel mit einer Größe von 20 bis maximal 1000 nm, die sich als Wirkstoffträgersystem für therapeutische Nucleinsäuren eignen. Ein optimales Nanopartikelsystem sollte über folgende Eigenschaften verfügen: homogene Größenverteilung (Polydispersitätsindex  $<1$ ), hohe Beladungskapazität für den Wirkstoff, Stabilität (Zetapotential  $\neq 0$  mV) und Biokompatibilität.

#### Protikel:

Protikel sind Nanosphärulen, die aus einem Geflecht von ODN-Protamin-Aggregaten bestehen. Größe und Stabilität der Protikel sind abhängig von dem Verhältnis Protamin zu ODN und von der Inkubationszeit. Diese beiden Parameter wurden variiert, um ein optimales Nanopartikelsystem zu schaffen.

#### a) Mischungsverhältnis ODN zu Protamin:

Bei der Herstellung der CpG-B-Protikel wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von Protamin zu CpG-B getestet. Die Größe und der Polydispersitätsindex der hergestellten Protikel wurden gemessen. Die Inkubationszeit betrug in allen Experimenten fünf Minuten.

Verhältnis ODN/Protamin	Größe der Protikel (nm)	Polydispersitätsindex	Anzahl der Versuche
1:3	522,7	0,026	1
1:2.5	446,1	0,036	1
1:2	202,5 $\pm$ 31,6	0,051	5

**Tab. 3.1:** Einfluss des Mischungsverhältnisses ODN zu Protamin auf Polydispersitätsindex und Größe der Protikel. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde der Polydispersitätsindex und die Größe mittels PCS bestimmt.

Die in Tabelle 3.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mit steigendem Anteil an Protamin die Partikelgröße zunahm. Da eine möglichst kleine Größe angestrebt werden sollte, wurden für alle weiteren Versuche die Protikel mit dem Mischungsverhältnis 1:2

gewählt. Das Zetapotential dieser Protikel betrug 48,33 mV ( $\pm 10,54$  mV; n=4). Protikel mit dem Mischungsverhältnis 1:1 und 1:1,5 sind instabil und wurden daher nicht untersucht.

b) Inkubationszeit:

Die Größe und der Polydispersitätsindex der Protikel wurden nach einer Inkubationszeit von 5, 10 und 20 Minuten gemessen. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führte zu einer Zunahme der Größe und zu einer Abnahme des Polydispersitätsindex (Tab. 3.2).

Inkubationszeit	Größe der Protikel (nm)	Polydispersitätsindex
<b>5 Minuten</b>	164,2	0,015
<b>10 Minuten</b>	209,6	0,01
<b>20 Minuten</b>	244,6	0,008

**Tab. 3.2:** Einfluss der Inkubationszeit auf Polydispersitätsindex und Größe der Protikel. ODN und Protamin wurden im Verhältnis 1:2 gemischt nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurde der Polydispersitätsindex und die Größe mittels PCS bestimmt.

Laut Junghans [Junghans 2000] erhöht sich mit steigender Inkubationszeit der Anteil der positiv geladenen Protamin-Moleküle an der Oberfläche. Erwünscht ist jedoch ein hoher Anteil an Oligonukleotiden an der Protikel-Oberfläche um eine Erkennung durch die Zelle zu gewährleisten. Da eine kleine Größe und ein hoher Anteil an ODN an der Protikeloberfläche erwünscht sind, wurde für alle weiteren Versuche die Inkubationszeit von 5 Minuten gewählt.

Zur Herstellung der CpG-A-Protikel wurden die gleichen Konditionen gewählt, die für CpG-B-Protikel als optimal definiert worden waren: Verhältnis ODN zu Protamin 1:2, Inkubationszeit 5 Minuten. Die Größe der CpG-A-Protikel belief sich unter diesen Versuchsbedingungen auf  $158,3 \pm 20$  nm. Der Polydispersitätsindex betrug 0,26 und das Zetapotential 19,8 bei einer Versuchszahl von n=4.

#### Polystyrolnanopartikel:

Die an der Universität Tübingen nach dem Verfahren der Emulsions-Polymerisation hergestellten Nanopartikel waren 180 nm groß und verfügten über eine homogene Größenverteilung [Fritz 1997]. Die Konzentrationsbestimmungen im Überstand der ODN-beladenen Nanopartikel ergaben, dass durchschnittlich 67,6 % der eingesetzten Menge

von CpG-B (n=4) an Nanopartikel gebunden wurden; dies entspricht einer Beladungskapazität von 2,67  $\mu\text{mol}$  ODN pro Gramm Nanopartikel. Im Vergleich dazu wurde für CpG-A lediglich eine Beladungsrate von 1,4  $\mu\text{mol}$  ODN pro Gramm Nanopartikel erreicht; dies entspricht 35,5 % der eingesetzten ODN-Menge. Die maximale Beladungskapazität der Nanopartikel beträgt für ein 15 mer ODN 3  $\mu\text{mol}$  ODN pro Gramm Nanopartikel [Fritz 1997].

#### 3.3.2 Einfluss auf die Zytokinproduktion

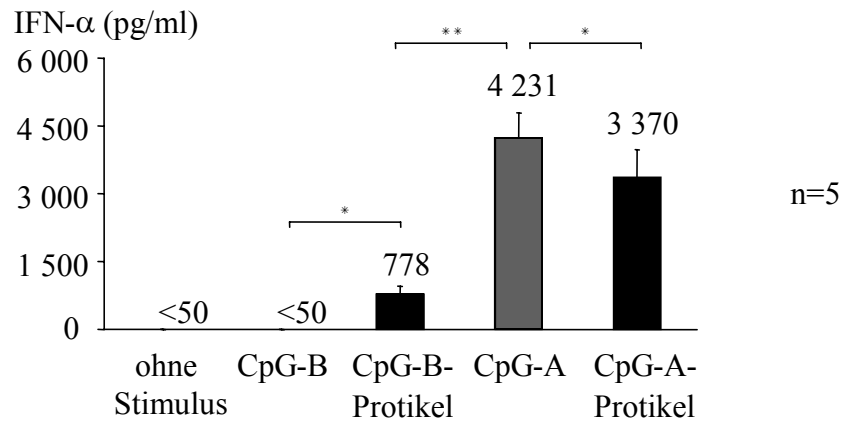
Gegenstand der folgenden Experimente war es, den Effekt von CpG-ODN-beladenen Nanopartikeln auf die Zytokinproduktion, insbesondere die IFN- $\alpha$ -Produktion, der PDCs zu untersuchen. Aufgrund der limitierten Versuchsanzahl bei Arbeiten mit plasmazytoiden dendritischen Zellen und der Tatsache, dass PDCs die Hauptproduzenten von IFN- $\alpha$  im peripheren Blut sind, wurden einige Vorversuche mit PBMCs durchgeführt.

##### Protikel:

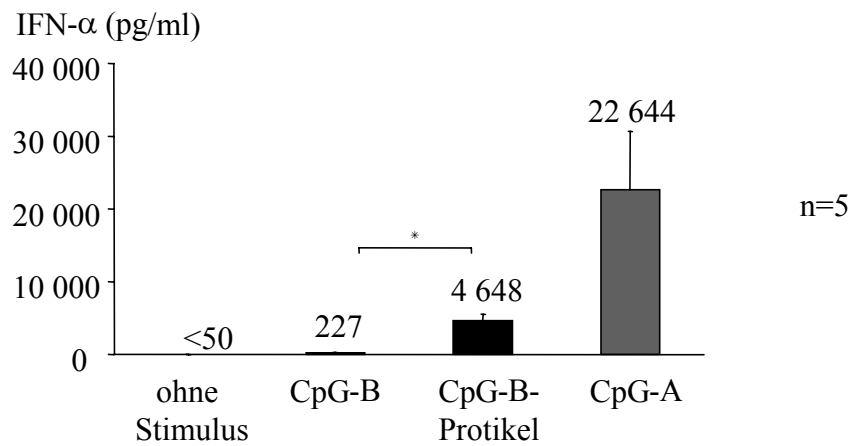
In PBMCs wurde die IFN- $\alpha$ -Produktion von CpG-B durch Komplexierung mit Protamin signifikant von 0 auf 778 pg/ml gesteigert. CpG-A-Protikel führten im Vergleich zu CpG-A alleine zu einer verringerten Produktion von IFN- $\alpha$  (Abb. 3.8A). Mit dem Kontroll-ODN 2137 konnte weder alleine noch im komplexierten Zustand als Protikel eine detektierbare IFN- $\alpha$ -Synthese in PBMCs erzielt werden.

Die Steigerung der IFN- $\alpha$ -Synthese durch die Komplexierung von CpG-B mit Protamin konnte für isolierte PDCs bestätigt werden. Im Vergleich zu CpG-B alleine konnte eine um Faktor 20 gesteigerte IFN- $\alpha$ -Produktion erzielt werden, wenn CpG-B-Protikel eingesetzt wurden (Abb 3.8B). Um den Einfluss auf andere Zytokine zu untersuchen, für die wahrscheinlich keine Struktur-Wirkungsbeziehung vorliegt, wurde die TNF- $\alpha$ -Produktion als weiterer Parameter gewählt. Hier konnte keine signifikante Veränderung der CpG-ODN-induzierten TNF- $\alpha$ -Synthese in PDCs beobachtet werden, wenn CpG-ODN mit Protamin komplexiert wurde (Abb 3.8C).

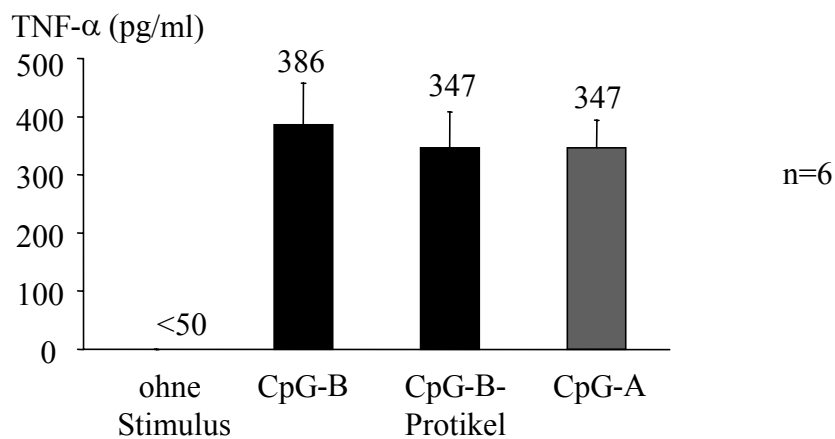
**A PBMC**



**B PDC**

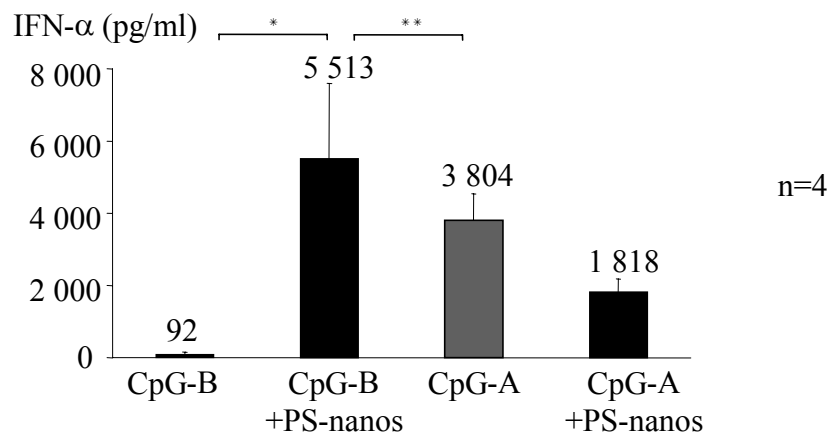


**C PDC**

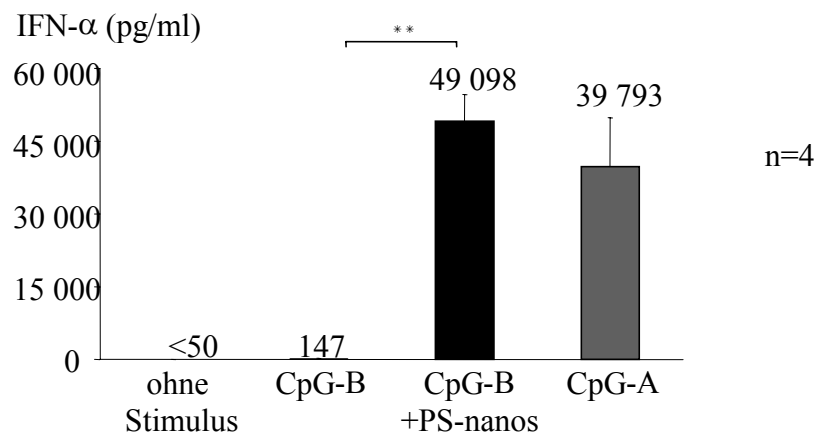


**Abb. 3.8:** Einfluss von CpG-Protikeln auf die Zytokinproduktion von PBMCs und PDCs: PDCs (250 000 Zellen/ml) oder PBMCs (2 Mio Zellen/ml) wurden 48 Stunden mit CpG-ODN ( $c = 3 \mu\text{g/ml}$ ) oder mit CpG-ODN-Protikeln inkubiert. Die IFN- $\alpha$ -Produktion von PBMCs (A) und PDCs (B) sowie die TNF- $\alpha$ -Produktion (C) von PDCs wurde mittels ELISA detektiert.

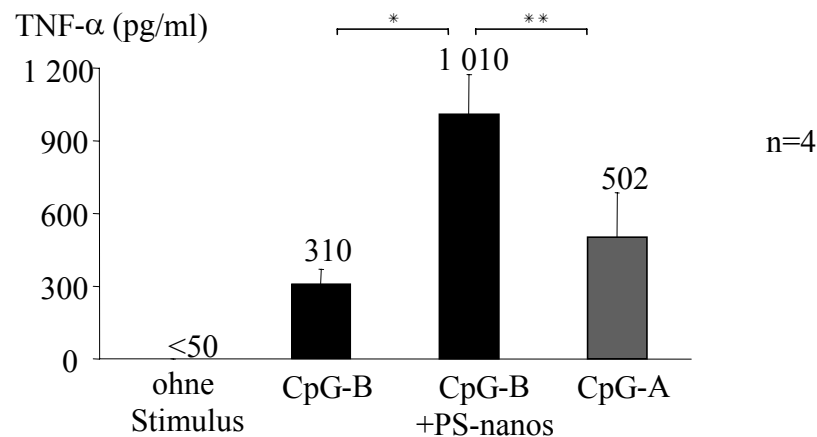
## A PBMC



## B PDC



## C PDC



**Abb. 3.9:** Einfluss von CpG-ODN-beladenen Polystyrolnanopartikeln auf die Zytokinproduktion von PBMCs und PDCs: PDCs (250 000 Zellen/ml) oder PBMCs (2 Mio Zellen/ml) wurden 48 Stunden mit CpG-ODN ( $c = 3 \mu\text{g/ml}$ ) oder mit CpG-ODN-beladenen Polystyrolnanopartikeln (PS-nanos) inkubiert. Die IFN- $\alpha$ -Produktion von PBMCs (A) und PDCs (B) sowie die TNF- $\alpha$ -Produktion (C) von PDCs wurde mittels ELISA detektiert.

#### Polystyrolnanopartikel:

Die Bindung von CpG-B an Polystyrolnanopartikel (PS-nanos) führte zu einer drastischen Steigerung der IFN- $\alpha$ -Produktion in PBMCs (Abb.3.9A) sowie auch in isolierten PDC (Abb. 3.9B). Hier wurde eine signifikante Steigerung um den Faktor 335 von 146 auf 49 097 pg/ml erreicht. Durch die Bindung von CpG-B an Polystyrolnanopartikel wurden äquivalent hohe Mengen an IFN- $\alpha$  induziert wie nach der Stimulation mit CpG-A. Wie zuvor bei den Protikelexperimenten beobachtet, führte die Kopplung von CpG-A an Polystyrolnanopartikel zu einer Reduktion der IFN- $\alpha$ -Synthese in PBMCs (Abb.3.9A). Das Kontroll-ODN 2017 induzierte weder alleine, noch gebunden an Polystyrolnanopartikel eine messbare IFN- $\alpha$ -Sekretion. Die Analyse der TNF- $\alpha$ -Produktion ergab, dass die Bindung von CpG-B an Polystyrolnanopartikel zu einer signifikanten Steigerung der TNF- $\alpha$ -Synthese in PDCs führte. Das Ausmaß der Steigerung beläuft sich jedoch nur auf eine Vervielfachung um Faktor drei und ist somit verglichen mit der bei IFN- $\alpha$  beobachteten Steigerung (Faktor 335) äußerst gering.

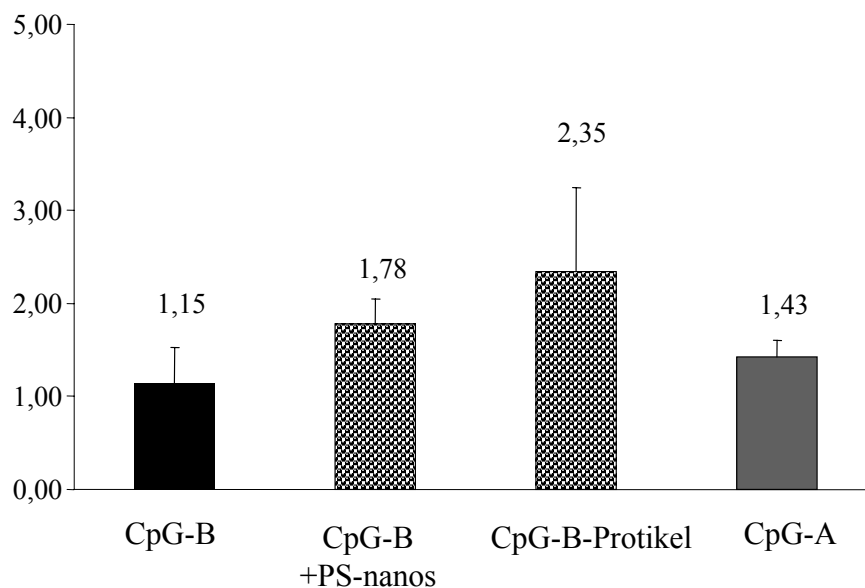
#### 3.3.3 Aufnahme in plasmazytoide dendritische Zellen

Durch die Bindung von Oligonukleotiden an Nanopartikel kann deren Aufnahme in die Zelle erhöht werden [Lambert 2001a]. Die Neutralisation der negativ geladenen Oligonukleotide durch die Bindung an positiv geladene Nanopartikel erleichtert das Überwinden der Zellmembran. Die Aufnahme von Nanopartikeln ist Endozytose-vermittelt. Geklärt werden sollte, ob die Steigerung der IFN- $\alpha$ -Produktion in PDCs durch die Bindung von CpG-B an Nanopartikel auf eine erhöhte Aufnahme der Oligonukleotide zurückzuführen ist. Hierzu wurden PDCs mit FITC-ODN oder mit Nanopartikeln, die mit FITC-ODN beladen waren, inkubiert [Junghans 2000]. Die Inkubation erfolgte entweder bei 37°C oder bei 4°C (Negativkontrolle). Nach 1,5 Stunden wurde die Aufnahme im Durchflusszytometer untersucht. Die Bindung der FITC-markierten CpG-ODN an Nanopartikel veränderte die Fluoreszenzintensität. Bei der Protikelbildung mit FITC-ODN konnte man eine Farbveränderung von gelb nach rot beobachten, die auch in der Literatur beschrieben wurde [Junghans 2000]. Daher konnte die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der PDC nach Inkubation mit FITC-ODN oder mit FITC-ODN-Nanopartikeln nicht direkt verglichen werden. Stattdessen wurden die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Negativkontrolle mit der MFI der bei 37°C inkubierten Probe

verglichen. Anschließend wurde der Faktor berechnet, um den die MFI bei 37°C Inkubation zunahm.

Der Abbildung 3.10 ist zu entnehmen, dass durch die Bindung von CpG-B an Polystyrolnanopartikel die Aufnahme kaum gesteigert wurde. CpG-B-Protikel führten, verglichen mit CpG-B alleine, zu einer Verdoppelung der Aufnahme. Die Aufnahme von CpG-A versus CpG-B in PDCs unterscheidet sich kaum. Somit scheint die Steigerung der IFN- $\alpha$ -Produktion in PDCs durch die Bindung von CpG-B an Nanopartikel nicht mit einer gesteigerten Aufnahme der ODN zu korrelieren. Ebenso scheint die erhöhte IFN- $\alpha$ -Induktion durch CpG-A nicht mit einer gesteigerten Aufnahme in die Zelle einherzugehen.

Faktor der Zunahme des Mittelwertes (MFI):  
Aufnahme bei 37°C versus Aufnahme bei 4°C



**Abb. 3.10:** Aufnahme von FITC-ODN und FITC-ODN-beladenen Nanopartikeln: Gemessen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der PDC nach Inkubation (1,5 h) mit FITC-ODN  $\pm$  Nanopartikel bei 4°C und bei 37°C. Der Faktor, um den die mittlere Fluoreszenzintensität zunahm, wurde berechnet. n=2

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Bindung von CpG-B an Nanopartikel zu einer erheblichen Steigerung der IFN- $\alpha$ -Produktion in PDCs führt. Im Gegensatz hierzu konnte durch die Bindung von CpG-A an Nanopartikel keine weitere Steigerung der IFN- $\alpha$ -Synthese erreicht werden. Der Einsatz von Polystyrolnanopartikeln erwies sich als potenter verglichen mit dem Einsatz von Protikeln. Die Steigerung der IFN- $\alpha$ -



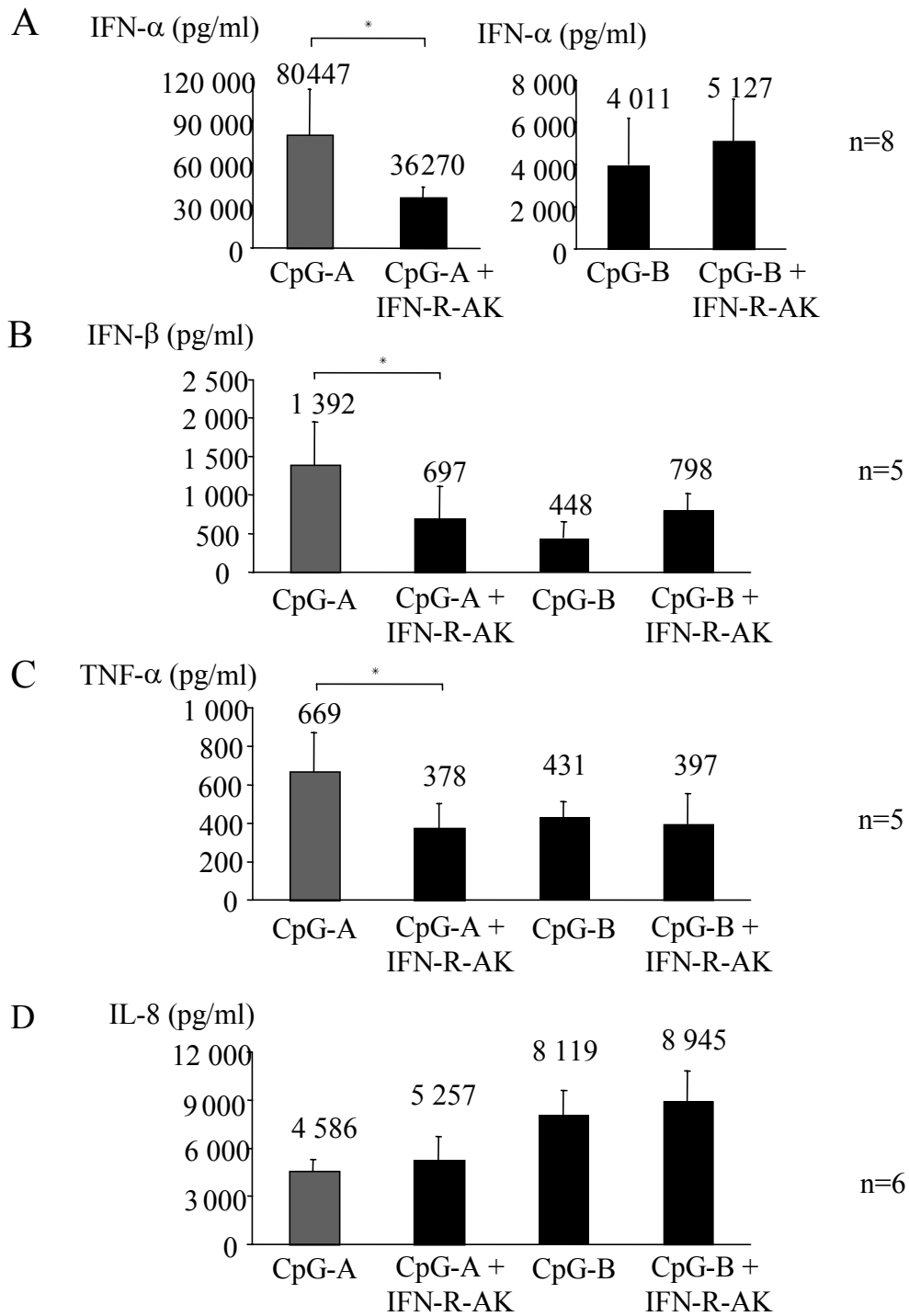
Sekretion ist nicht mit einer gesteigerten Aufnahme korrelierbar. Die Synthese anderer Zytokine wie TNF- $\alpha$  wird nur geringfügig erhöht und nicht in dem Ausmaß wie die IFN- $\alpha$ -Produktion.

#### 3.4 Mechanismen der unterschiedlichen Wirkung von CpG-A und CpG-B

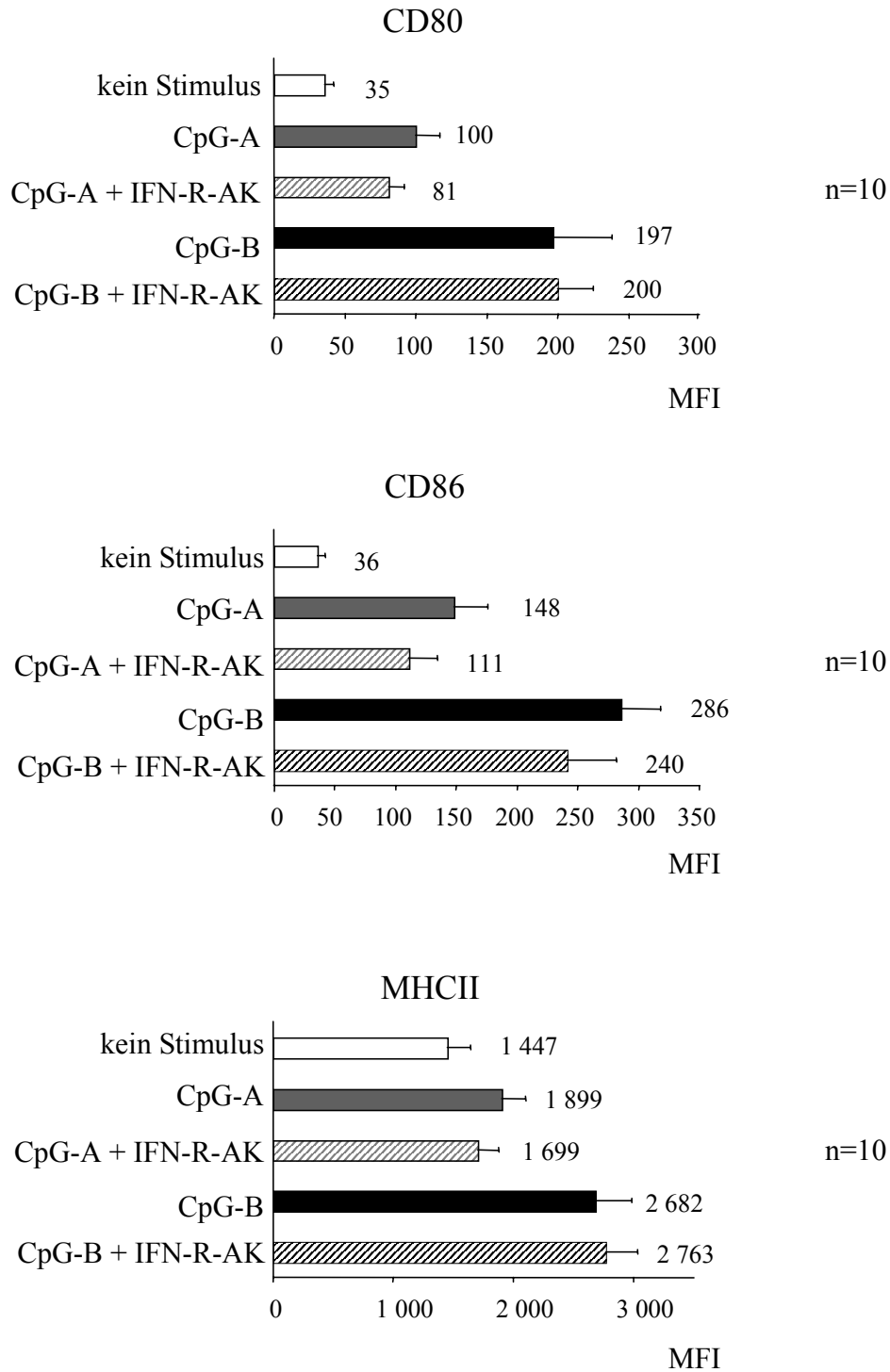
Die bis dato gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die unterschiedlichen Effekte der beiden CpG-ODN Klassen auf PDCs nicht nur quantitativer, sondern auch qualitativer Natur sind. CpG-A induziert höhere Mengen an Typ I IFN, CpG-B hingegen führt zu einer stärkeren Aktivierung der Zelle und zu einer höheren Produktion von IL-8. Es ist anzunehmen, dass beide Klassen von CpG-ODN unterschiedliche Signaltransduktionswege in der PDC aktivieren. Um dieses näher zu untersuchen, folgten Versuche mit Antikörpern, die in die IFN- $\alpha$ -Synthese der PDC eingreifen.

##### 3.4.1 Blockade des Typ I IFN-Rezeptors

Die Produktion von Typ I IFN wird wie unter 1.3.1 beschrieben durch einen positiven autokrinen Rückkopplungsmechanismus gesteuert. In der frühen Phase der Typ I IFN-Produktion gebildetes IFN- $\alpha$ / $\beta$  aktiviert den Typ I IFN-Rezeptor (IFN-R) und initiiert dadurch die Produktion von weiterem Typ I IFN. Die frühe Phase der Typ I IFN-Synthese ist in der Regel unabhängig von einer Aktivierung des Typ I IFN-Rezeptors im Gegensatz zur späten Phase. Die Blockade des Typ I IFN-Rezeptors erlaubt daher die Unterscheidung zwischen früher und später Phase der Typ I IFN-Produktion. PDCs wurden mit CpG-ODN und Typ I IFN-Rezeptor-Antikörper (IFN-R-AK) inkubiert. Zytokin- und Chemokinsynthese sowie Aktivierung der PDC wurden nach 48-stündiger Kultivierung untersucht.



**Abb. 3.11:** Einfluss der Blockade des Typ I IFN-Rezeptors auf die CpG-ODN-vermittelte Zytokin- und Chemokinsynthese in PDCs: PDCs (250 000 Zellen/ml) wurden 48 Stunden mit CpG-ODN ( $c = 6 \mu\text{g/ml}$ ) und Typ I IFN-Rezeptor-Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Konzentrationen von IFN- $\alpha$  (A), IFN- $\beta$  (B), TNF- $\alpha$  (C) und IL-8 (D) im Überstand gemessen.



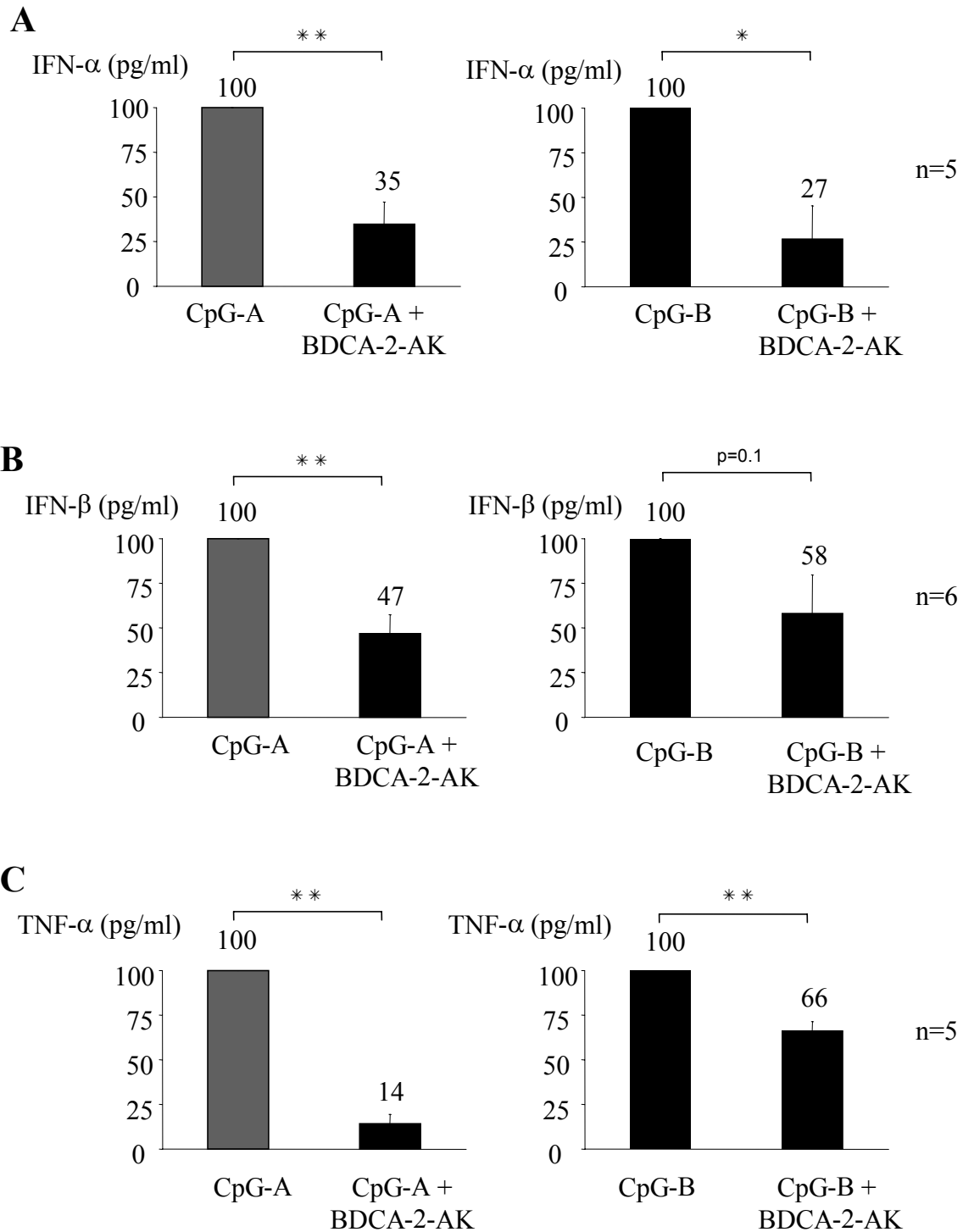
**Abb. 3.12:** Einfluss der Blockade des Typ I IFN-Rezeptors auf die CpG-ODN-vermittelte Aktivierung der PDC:  
PDCs (250 000 Zellen/ml) wurden 48 Stunden mit CpG-ODN ( $c = 6 \mu\text{g/ml}$ ) und Typ I IFN-Rezeptor-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD80, CD86 und MHC II durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Blockade des Typ I IFN-Rezeptors führte zu einer signifikanten Reduktion der CpG-A-vermittelten Produktion von IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Abb. 3.11). Die durch CpG-B-hervorgerufene Sekretion dieser Zytokine blieb unbeeinflusst von der Blockade des Typ I IFN-Rezeptors (Abb. 3.11A; leichter aber nicht signifikanter Anstieg von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ). Der Typ I IFN-Rezeptor Antikörper veränderte die CpG-vermittelte IL-8-Induktion nicht (Abb. 3.11D). Auch die CpG-vermittelte Aufregulation kostimulatorischer und Antigen-präsentierender Moleküle wurde nicht signifikant von der Typ I IFN-Rezeptor-Blockade beeinflusst (Abb. 3.12). Die beobachteten Effekte waren spezifisch für den Typ I IFN-Rezeptor Antikörper, da ein Kontroll-Antikörper keine hemmende Aktivität zeigte (CpG-A: 218 804 versus CpG-A und Kontroll-Antikörper: 207 192 pg/ml IFN- $\alpha$ , n=2).

#### 3.4.2 Aktivierung des BDCA-2-Moleküls

Dzionic et al. [Dzionic 2001] zeigten, dass die Aktivierung des PDC-spezifischen C-Typ-Lektins BDCA-2 mit einem aktivierenden monoklonalen Antikörper die durch Influenza-Virus induzierte IFN- $\alpha$ -Produktion in PDCs hemmt. Ziel der folgenden Versuche war es, den Einfluss der BDCA-2-Aktivierung auf die CpG-ODN-vermittelten Effekte in PDCs zu untersuchen. Dies sollte Aufschluss darüber geben, welche Funktion BDCA-2 in der Zytokinproduktion der PDC zukommt.

Die Aktivierung des BDCA-2-Moleküls führte zu einer signifikanten Hemmung der CpG-A- und CpG-B-vermittelten Produktion von IFN- $\alpha$  (Abb. 3.13A). Außerdem wurde die CpG-vermittelte IFN- $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Synthese durch den BDCA-2-Antikörper gehemmt (Abb. 3.13B,C). Der Vergleich mit einem Kontrollantikörper machte deutlich, dass die beobachteten Effekte spezifisch für den BDCA-2-Antikörper waren [Kerkmann 2003].



**Abb. 3.13:** Einfluss der Aktivierung von BDCA-2 auf die CpG-ODN-vermittelte Zytokinsynthese in PDCs: PDCs (250 000 Zellen/ml) wurden mit CpG-ODN (c=6 µg/ml) und BDCA-2-Antikörper, wie in 2.4 beschrieben, inkubiert. Anschließend wurden die Konzentrationen von IFN-α (A), IFN-β (B) und TNF-α (C) im Überstand gemessen. Die Hemmung der Zytokinsynthese durch den BDCA-2-AK ist abgebildet als Prozent der Kontrolle ohne BDCA-2-AK.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die beiden Klassen von CpG-ODN unterschiedliche Signaltransduktionswege in PDCs aktivieren. Die durch CpG-A-vermittelte IFN- $\alpha$ -, IFN- $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Produktion wird über den Typ I IFN-Rezeptor amplifiziert. Im Gegensatz dazu ist die durch CpG-B-induzierte Zytokinproduktion unabhängig von diesem Rückkopplungsmechanismus. Die CpG-vermittelte IL-8-Produktion und Aktivierung der PDC ist unabhängig von dem Typ I IFN-Rezeptor. Dieser Befund erklärt, warum CpG-B bezüglich dieser Parameter aktiver sein kann als CpG-A. BDCA-2 beeinflusst selektiv die Typ I IFN-Synthese, die unabhängig vom Typ I IFN-Rezeptor ist und von beiden CpG-ODN-Klassen aktiviert wird. Zudem greift BDCA-2 in die IFN- $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Synthese der PDC ein.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die strukturellen Unterschiede zwischen CpG-A und CpG-B untersucht. Die Ergebnisse belegen, dass CpG-A, aber nicht CpG-B, die Fähigkeit besitzt, unter physiologischen Salzkonzentrationen multimolekulare Komplexe zu bilden, die mit dem AFM sichtbar gemacht werden können. Diese multimolekularen Komplexe sind heterogen und weisen einen partikulären Charakter auf. Ihr Durchmesser liegt zwischen 40 und 60 nm. Die Fähigkeit von CpG-A, diese Komplexe zu bilden, scheint auf der Koexistenz von einer zentralen Palindromsequenz und Poly-G-Motiven zu beruhen. Kontroll-ODN, denen eines dieser beiden Strukturmerkmale fehlt, zeigen eine reduzierte Komplexbildung.

Die Frage nach einem Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung führte zum zweiten Teil dieser Dissertation, der sich mit den biologischen Unterschieden der beiden CpG-ODN-Klassen beschäftigte. CpG-A und CpG-B unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf PDCs. CpG-B führt zu einer stärkeren Aktivierung der Zelle und induziert höhere Mengen an IL-8. Der markanteste Unterschied der beiden CpG-Klassen bezüglich ihrer Wirkung auf PDCs besteht in der Induktion der IFN- $\alpha$ -Produktion. CpG-A induziert 35-fach höhere Mengen an IFN- $\alpha$  als CpG-B. Die Veränderung des Palindroms sowie die Substitution der Poly-G-Motive durch Poly-C-Motive führte bei CpG-A zu einer reduzierten Komplexbildung und auch zu einer verminderten Fähigkeit, IFN- $\alpha$  in PDCs zu induzieren.

Wird CpG-B durch die Bindung an Nanopartikel eine partikuläre Struktur verliehen, so führt dies zu einer signifikanten Steigerung der IFN- $\alpha$ -Produktion in PDCs. Es werden äquivalent hohe Mengen an IFN- $\alpha$  induziert wie nach einer Stimulation mit CpG-A. Durch die Bindung von CpG-A an Nanopartikel wird die IFN- $\alpha$ -Synthese nicht erhöht. Der Einsatz von Polystyrolnanopartikeln erwies sich als potenter verglichen mit dem Einsatz von Protikeln. Die Steigerung der IFN- $\alpha$ -Produktion in PDCs durch die Bindung von CpG-B an Nanopartikel ist nicht mit einer gesteigerten Aufnahme in die Zelle

korrelierbar. Die Synthese anderer Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , wird nur geringfügig erhöht und nicht in dem Ausmaß wie die IFN- $\alpha$ -Produktion.

Die beiden Klassen von CpG-ODN aktivieren unterschiedliche Signaltransduktionswege in der PDC. Die durch CpG-A-vermittelte IFN- $\alpha$ -, IFN- $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Produktion wird über den Typ I IFN-Rezeptor amplifiziert. Im Gegensatz dazu ist die durch CpG-B-induzierte Zytokinproduktion unabhängig von diesem Rückkopplungsmechanismus. Die CpG-ODN-vermittelte IL-8-Produktion und Aktivierung der PDC ist unabhängig von dem Typ I IFN-Rezeptor. Dieser Befund erklärt, warum CpG-B bezüglich dieser Parameter aktiver ist als CpG-A. BDCA-2 beeinflusst selektiv den Teil der Typ I IFN-Synthese, der unabhängig vom Typ I IFN-Rezeptor ist und von beiden CpG-ODN-Klassen aktiviert wird.

In Abbildung 4.1 ist eine Zusammenfassung der erhobenen Daten zu sehen, die die Unterschiede zwischen CpG-A und CpG-B betreffen.



## CpG-A

## CpG-B

### Struktur

Bildet partikelartige höher-  
molekulare Komplexe



Keine Komplexbildung

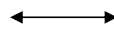
### IFN- $\alpha$ -Induktion in PDCs

Induziert **hohe** Mengen



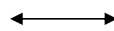
Induziert **niedrige** Mengen

Teilweise **abhängig** vom  
Typ I IFN-Rezeptor



**Unabhängig** vom  
Typ I IFN-Rezeptor

Durch Bindung von CpG-A an  
Nanopartikel **keine Steigerung**



Durch Bindung von CpG-B an  
Nanopartikel **extreme Steigerung**

Abhängig von BDCA-2



Abhängig von BDCA-2

### Weitere Wirkungen auf PDCs

**Niedrige** IL-8-Induktion



**Hohe** IL-8-Induktion

**Hohe** IFN- $\beta$ -Induktion



**Niedrige** IFN- $\beta$ -Induktion

**Schwache** Aktivierung der Zelle  
(CD86, CD80, MHCII)



**Starke** Aktivierung der Zelle  
(CD86, CD80, MHCII)

Gleich hohe TNF- $\alpha$ -Induktion



Gleich hohe TNF- $\alpha$ -Induktion

**Abb. 4.1:** Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen CpG-A und CpG-B.

### 4.2 Strukturanalyse von CpG-Oligonukleotiden

#### 4.2.1 Methodendiskussion

##### Wahl der Methode

Zur strukturellen Analyse der Komplexbildung von Guanin-reichen Oligonukleotiden bieten sich eine Reihe von verschiedenen Analysemethoden an, wie z.B. die NMR-Spektroskopie (NMR = *Nuclear magnetic resonance*), die Röntgenstrukturanalyse, die Gelelektrophorese, die Gelpermeationschromatographie oder die Rasterkraftmikroskopie [Keniry 2000]. Jede dieser Methoden liefert eine andere Art der Information über die Nukleinsäure-Komplexe. Je nach Fragestellung muss daher die geeignete Methode gewählt werden. Ziel der hier vorliegenden Dissertation war es, zu untersuchen, ob die beiden Klassen von CpG-ODN sich in ihrer Fähigkeit unterscheiden, inter- und intramolekulare Bindungen einzugehen und höher-molekulare Komplexe zu bilden. Ist dies der Fall, so sollten die gebildeten Komplexe näher charakterisiert werden.

Zur Klärung des ersten Punktes ist die native Gelelektrophorese eine äußerst geeignete Methode [Marsh 1994; Basu 1997]. Sie ermöglicht den direkten Vergleich mehrerer Oligonukleotide und gibt Aufschluss darüber, ob die Oligonukleotide die Fähigkeit zur Bildung von inter- und intramolekularen Bindungen besitzen. Außerdem liefert sie im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie Informationen darüber, ob das Oligonukleotid nur einen Komplex bildet, oder ob mehrere Komplexe in Lösung vorliegen. Die NMR-Spektroskopie erlaubt nur eine limitierte Aussage über die Struktur von Oligonukleotiden, die mehr als eine kinetisch stabile Konformation besitzen.

Zur Charakterisierung der gebildeten Komplexe eignet sich die Rasterkraftmikroskopie. Diese hochauflösende Mikroskopiemethode wurde bereits zur Abbildung von DNA-haltigen Proben verwendet [Marsh 1995; Hansma 1996]. Verglichen mit der Elektronenmikroskopie weist sie den Vorteil auf, dass bei Raumtemperatur und unter physiologischen Bedingungen gearbeitet wird, wohingegen die Elektronenmikroskopie nur Aufnahmen im Vakuum ermöglicht. Vakuum kann jedoch die Struktur DNA-haltiger Proben verändern. Die Rasterkraftmikroskopie liefert Informationen über das Aussehen der entstandenen Komplexe, jedoch nicht über deren genaue Zusammensetzung. Hierzu

könnten Methoden wie die Röntgenstrukturanalyse oder die Gelpermeationschromatographie dienen. Die Röntgenstrukturanalyse weist den Nachteil auf, dass sie sehr zeitaufwändig ist und beim Auskristallisieren nur ein Komplex auskristallisiert wird. Bei heterogenen Lösungen, in denen eine Vielzahl von verschiedenen Komplexen vorliegen, müssten alle Komplexe auskristallisiert werden, um eine Aussage über Aufbau und Genese der Komplexe treffen zu können [Keniry 2000]. Die Gelpermeationschromatographie liefert nur beschränkte Information über das Aussehen und die Form der Komplexe. Sie kann allerdings genauen Aufschluss darüber geben, wieviele Moleküle an der Komplexbildung beteiligt sind [Marshall 2003].

### Gelelektrophorese

Agarosegele sind einfacher in der Herstellung und Handhabung, weisen aber ein geringeres Auftrennungsvermögen für DNA mit weniger als 100 bp (bp = Basenpaaren) auf. Im Gegensatz dazu sind Polyacrylamidgele schwieriger herzustellen, verfügen allerdings über ein höheres Auftrennungsvermögen und eine höhere Ladekapazität ohne Auflösungsverluste. DNA-Stränge mit einer Länge von 5 bis 500 bp können mittels Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden [Lottspeich 1998]. Die hier etablierte Gelelektrophorese sollte der Bestimmung der Komplexbildung einzelsträngiger Oligonukleotide im Größenbereich von 20 bis 24 bp dienen. Daher wurde die für diesen DNA-Größenbereich geeignete Polyacrylamidgelelektrophorese gewählt.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Oligonukleotide zu markieren, um sie auf dem Gel detektieren zu können. Durch die Markierung sollte die Struktur der Oligonukleotide so wenig wie möglich verändert werden. Die Markierung mit Makromolekülen wie Digoxin ist daher ungeeignet. Die Oligonukleotide wurden mit radioaktivem Phosphor ( $^{32}\text{P}$ ) markiert. Hierbei wird eine  $^{32}\text{P}$ -enthaltende Phosphatgruppe an das 5'Ende der Oligonukleotide angehängt. Die Komplexbildung der ODN sollte dadurch nicht beeinträchtigt werden.

### Rasterkraftmikroskopie

Die Etablierung eines optimalen Protokolls für die Probenpräparation ist der wichtigste und schwierigste Punkt bei Arbeiten mit dem Rasterkraftmikroskop. Es zeigte sich, dass insbesondere das Entfernen jeglicher Salzreste durch mehrmaliges Spülen mit Wasser für Injektionszwecke sowie das vollkommene Trocknen der Probe sehr wichtig sind. Feuchtigkeitsreste können die Messung stören. Letztendlich erwies sich das anfängliche Trocknen unter dem Luftstrom der Werkbank und das anschließende Trocknen mit Stickstoffgas als optimal.

Es war nicht möglich, die Komplexbildung der CpG-ODN in RPMI-Medium zu untersuchen. Die Proben konnten nicht vollkommen getrocknet werden und waren von einer gelartigen Schicht überzogen. Dies kann auf die komplexe Zusammensetzung von RPMI-Medium zurückgeführt werden. RPMI-Medium enthält Makromoleküle wie Dextrose, diverse Aminosäuren und Vitamine, die einerseits die Oligonukleotide komplexieren und sich andererseits an die negativ geladene Glimmeroberfläche adsorbieren können.

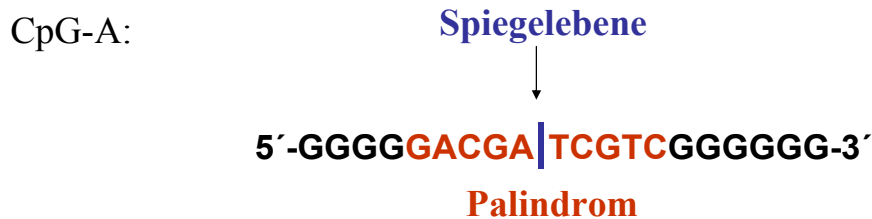
Die Messungen im Kontakt-Modus ergaben keine qualitativ hochwertigen Bilder. Ein Problem stellte insbesondere das Verschieben der Probe und die schnelle Kontamination der Spitze dar. Der Klopf-Modus weist im Vergleich zum Kontakt-Modus den Vorteil auf, dass die Probe bei der Messung nicht verschoben und beschädigt wird [Delain 1992].

#### 4.2.2 Diskussion der Ergebnisse

Einzelsträngige kurze DNA-Moleküle verfügen je nach Sequenz über die Fähigkeit, intra- und intermolekulare Bindungen einzugehen. Die Sequenz von CpG-A weist drei reaktive Zentren auf, die die Bildung von inter- und intramolekularen Bindungen begünstigen können:

1. Ein zentrales Palindrom:

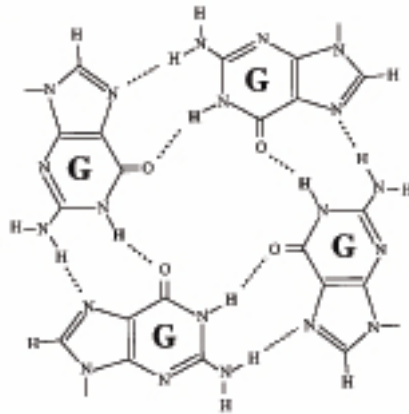
Ein Palindrom ist eine komplementäre Basenfolge, die an einer zentralen Ebene gespiegelt wird. Funktionell bedeutet dies, dass das Palindrom selbstkomplementär ist und Dimerisierung sowie Hairpin-Bildung begünstigt (siehe Abb. 4.2).



**Abb. 4.2:** Sequenz von CpG-A und Beispiele für Dimerisierung und Hairpin-Bildung.

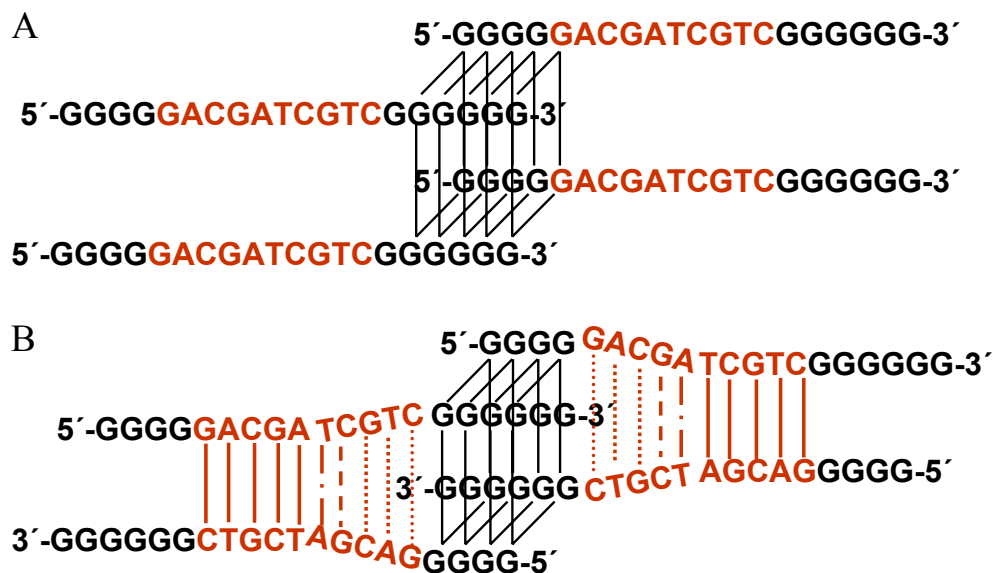
2. Poly-G-Motiv am 5'- und am 3'-Ende:

Als Poly-G-Motiv bezeichnet man eine Sequenz mit mehreren (>3) aufeinander folgenden Guanin-Molekülen. Ein Guanin-Molekül verfügt über vier reaktive Zentren, an denen Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können. Vier Guanin-Moleküle können über acht Wasserstoffbrückenbindungen ein zyklisches Basenquartett bilden, das auch als G-Tetrade bezeichnet wird. Die Wasserstoffbrückenbindungen der G-Tetrade werden auch Hoogsteen-Bindungen genannt [Gellert 1962].



**Abb. 4.3:** G-Tetrade, bestehend aus vier Guanin Molekülen [Phan 2002].

Eine einzelne G-Tetrade ist nicht sehr stabil. Weist eine Sequenz Poly-G-Motive auf, so können sich vier Einzelstränge unter Ausbildung mehrerer G-Tetraden zusammenlagern. In der Regel richten sich die vier Einzelstränge parallel zueinander aus, d.h. alle mit der gleichen Orientierung (5' nach 3'). Die Guanin Moleküle in der G-Tetrade befinden sich in diesem Fall alle in der anti-Konformation. In seltenen Fällen kann jedoch auch eine antiparallele Ausrichtung der vier Einzelstränge erfolgen – zum Beispiel wenn Watson-Crick-Basenpaarung die anti-parallele Orientierung der Stränge begünstigt. Dann befinden sich jeweils zwei Guanin Moleküle einer G-Tetrade in der syn- und zwei in der anti-Konformation.

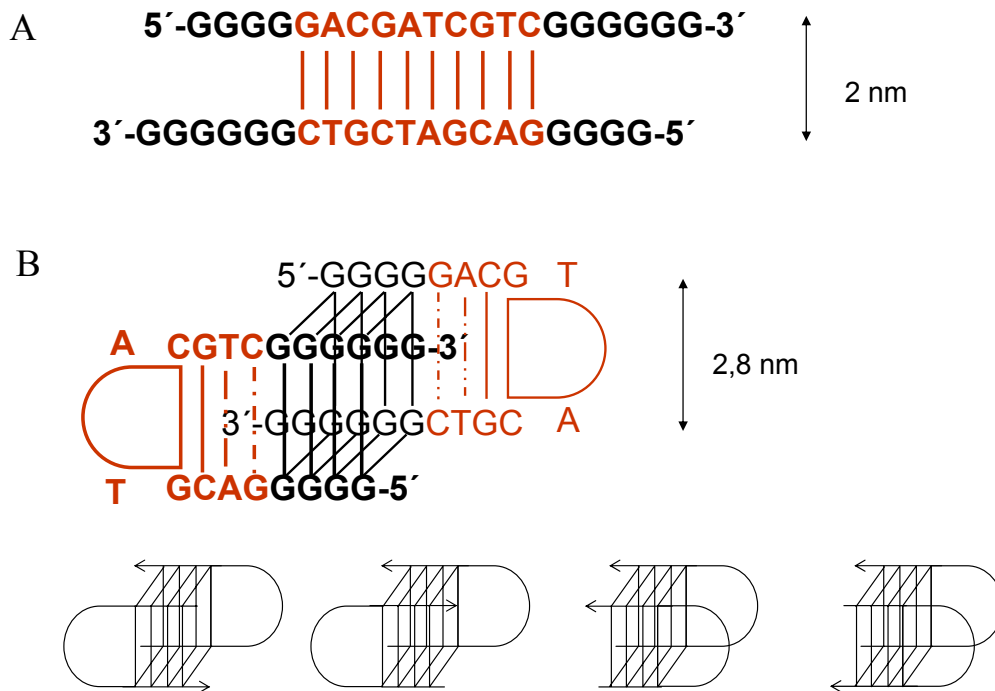


**Abb. 4.4:** G-Tetradenbildung von vier CpG-A-Molekülen, A: parallele und B: antiparallele Orientierung der Einzelstränge.

Im Gegensatz zu CpG-A weist die Sequenz von CpG-B keine reaktiven Zentren wie Palindrom oder Poly-G-Motive auf (siehe Abb. 4.5).

Die Ergebnisse der Gelelektrophorese machen deutlich, dass sich CpG-A und CpG-B in ihrer Fähigkeit unterscheiden, inter- und intramolekulare Bindungen einzugehen und Komplexe zu bilden. CpG-B zeigt ein einheitliches Laufverhalten auf dem Gel. Da CpG-B nicht über die Möglichkeiten verfügt, inter- oder intramolekulare Bindungen einzugehen, liegt es nur in einer einzigen Konformation vor, und zwar als Monomer. CpG-A hingegen lässt sich in mehrere Banden auftrennen, die unterschiedlichen Konformationen und Komplexen von CpG-A zugeordnet werden können. CpG-A besitzt die Fähigkeit, Komplexe, die aus mehreren CpG-A-Molekülen bestehen zu bilden. Zudem können diese verschiedenen Komplexe in unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Das Monomer von CpG-A kann in der Hairpin- und in der Einzelstrang-Konformation vorkommen (siehe Abb. 4.2). Im Gel kann die schneller wandernde Bande von CpG-A der Hairpin-Konformation des Monomers (HP) und die andere Bande dem einzelsträngigen Monomer zugeordnet werden (M) (Abb. 3.1). Das Dimer von CpG-A, dem die Bande D im Gel entspricht, kann ebenfalls unterschiedliche Konformationen annehmen: als Einzelstrang-Dimer (Abb. 4.5A) oder als Hairpin-Dimer (Abb. 4.5B). Je nach der Orientierung der Einzelstränge zueinander ergeben sich für das Hairpin-Dimer nochmals mehrere mögliche Konformationen.

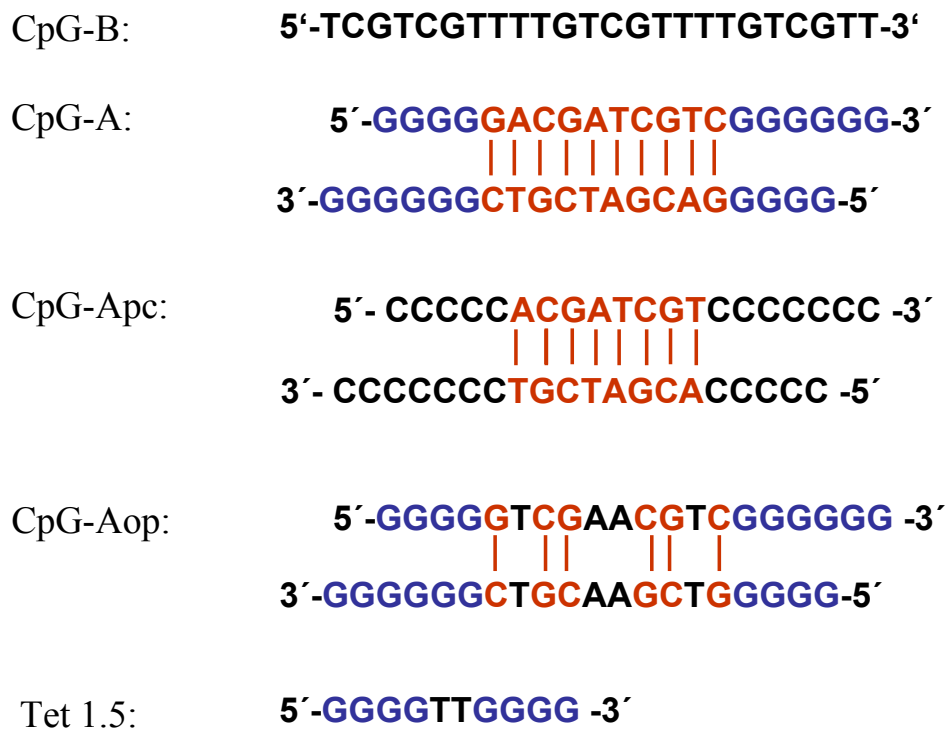
CpG-A-Dimer:



**Abb.4.5:** Konformationen des Dimers von CpG-A. Der Pfeil stellt einen CpG-A-Einzelstrang von 5' nach 3' dar.

Diese Befunde machen deutlich, dass bereits das Monomer und das Dimer von CpG-A in einer Vielzahl von verschiedenen Konformationen vorliegen können. Für höhermolekulare Komplexe aus mehreren ( $n > 3$ ) CpG-A-Molekülen ergeben sich daher zahlreiche Kombinationsmöglichkeiten. Der im Gel sichtbare „Bandenschmier“ (*smear of bands*) in der Region X (Abb. 3.1) ist typisch für höhermolekulare Komplexe Guanin-reicher Oligonukleotide [Marsh 1994; Marsh 1995; Gursel 2002]. Einzelne Banden können nicht differenziert werden. Eine eindeutige Zuordnung zu Komplexen mit einer definierten Anzahl an ODN-Molekülen ist nicht möglich. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese verdeutlichen, dass eine Lösung von CpG-A insbesondere durch ihre Heterogenität geprägt ist. Sie setzt sich aus einer Vielzahl von Komplexen zusammen, die in mehreren Konformationen vorliegen und aus unterschiedlich vielen CpG-A-Molekülen zusammengesetzt sind.



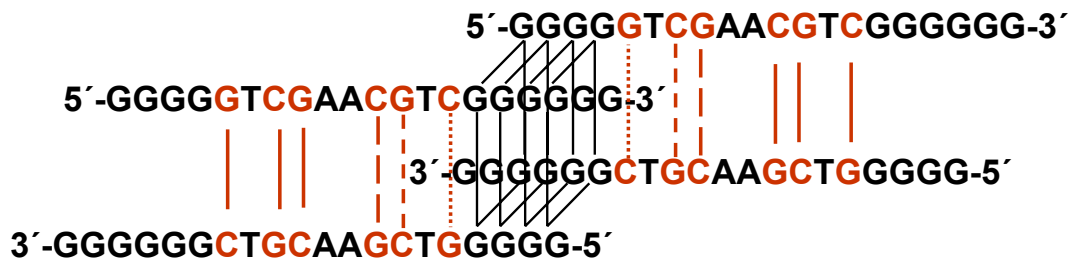


**Abb. 4.6:** Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide und deren Fähigkeit, aufgrund eines Palindroms (rot) zu dimerisieren. Blau: Poly-G-Motiv.

Durch den Vergleich mit Kontroll-ODN gelang es, die Bedeutung von Palindrom und Poly-G-Motiv in der Komplexgenese von CpG-A zu analysieren. Das Kontroll-ODN CpG-Apc weist im Vergleich zu CpG-A Poly-C-Motive statt Poly-G-Motive auf. Durch diese Substitution wurde das Palindrom um zwei Basen verkürzt (siehe Abb.4.6). Das einheitliche Laufverhalten im nativen Polyacrylamidgel macht deutlich, dass CpG-Apc nur in einer Konformation, höchstwahrscheinlich als Dimer, vorliegt (Abb. 3.1). Die acht Basen des Palindroms begünstigen die Dimerisierung von zwei Einzelsträngen, sie reichen jedoch nicht aus, um ein stabiles Hairpin-Dimer zu bilden (bindende Basen >3). Dieser Befund belegt, dass die Poly-G-Motive ein essenzielles Strukturelement für die Komplexbildung von CpG-A darstellen und bekräftigt die Hypothese, dass die Komplexbildung von CpG-A über G-Tetraden vermittelt ist.

Durch den Einbau von vier *Mismatches* (nicht-komplementäre Basen) in die zentrale Palindromsequenz von CpG-A entstand das Kontroll-ODN CpG-Aop (siehe Abb. 4.5). Dieses Oligonukleotid weist, verglichen mit CpG-A, ein verringertes Bandenspektrum auf, das sich aus sechs bis sieben Banden zusammensetzt (Abb. 3.1, Aop). Hairpin-

Bildung, Dimerisierung und Ausbildung von multi-molekularen Komplexen sind im Vergleich zu CpG-A verringert. Eine deutliche Bande von CpG-Aop, die zwischen D und X liegt, stellt höchstwahrscheinlich einen Komplex aus vier CpG-Aop-Molekülen dar (Abb. 4.6). Auch wenn vier nicht komplementäre Basen in das Palindrom eingebaut wurden, so verbleiben dennoch sechs komplementäre Basen. Durch diese zusätzliche Watson-Crick-Basenpaarung können die entstandenen G-Tetraden stabilisiert werden.



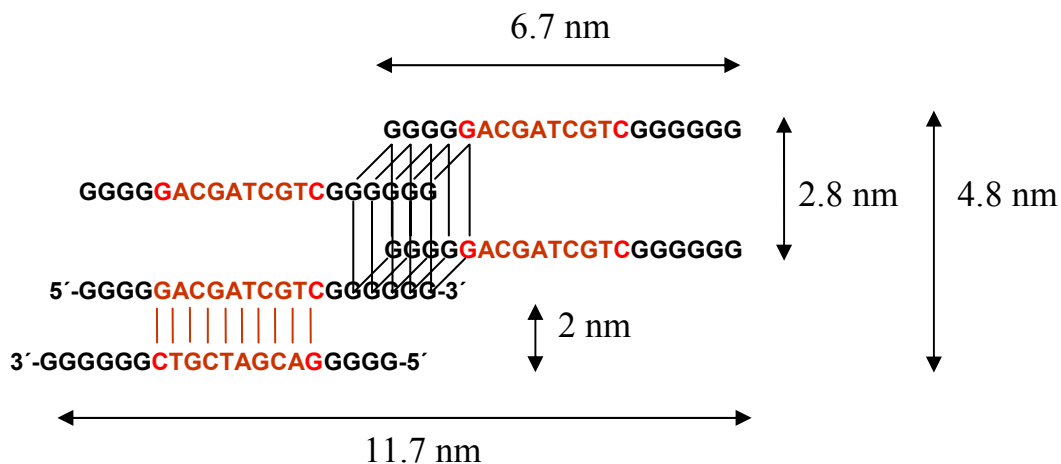
**Abb. 4.7:** Komplex aus vier CpG-Aop-Molekülen.

Oligonukleotide mit Poly-G-Motiven und ohne Palindromsequenz, wie das ODN Tet1.5, liegen unter physiologischer Salzkonzentration, die hier eingesetzt wurde, hauptsächlich als Monomer vor (Tet). Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse von Henderson, der beobachtete, dass ODN Tet1.5 unter hohen Salzkonzentrationen (*G-wire*-Puffer) multimolekulare *G-wire*-Strukturen bildet, unter physiologischen Salzkonzentrationen jedoch keine Komplexbildung aufweist.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass das Palindrom essenziell für die Komplexbildung von CpG-A ist. Die G-Tetradenbildung scheint durch die komplementäre Basenpaarung des Palindroms stabilisiert zu werden. Die Komplexbildung von CpG-A beruht somit auf der Koexistenz von Palindrom und Poly-G-Motiv.

Die Ergebnisse der Rasterkraftmikroskopie bestätigen den Befund, dass CpG-A und CpG-B sich wesentlich in ihren strukturellen Eigenschaften unterscheiden. Außerdem zeigen sie, dass die CpG-A-Lösung eine heterogene Lösung darstellt. Verschiedene Partikel unterschiedlicher Form und Größe sind auf den rastermikroskopischen Aufnahmen zu sehen. Zudem verdeutlichen die AFM-Aufnahmen, dass CpG-A sowohl in *G-wire*-Puffer als auch in PBS partikelartige Strukturen ausbildet.

Die Größenmessung dieser Partikel erlaubt eine ungefähre Extrapolation, wieviele Moleküle an dem Aufbau beteiligt sind. Die Höhe einer G-Tetrade beträgt 2,8 nm und die Höhe von doppelsträngiger DNA beläuft sich auf 2 nm. Diese Daten wurden mittels Röntgenstrukturanalyse erhoben [Kang 1992; Laughlan 1994]. Henderson analysierte mittels Rasterkraftmikroskopie den Aufbau der durch das ODN Tet 1.5 gebildeten *G-wire*-Strukturen. Die Höhenmessungen ergaben, dass diese Strukturen eine durchschnittliche Höhe von 2,5 nm hatten. Henderson folgerte daraus, dass es sich bei den Strukturen um mehrere ODN Tet1.5-Moleküle handelt, die über G-Tetraden am 3'- und 5'-Ende linear miteinander verbunden sind, sogenannte *G-wires* [Marsh 1995]. Die Höhe der hier analysierten CpG-A-Partikel beträgt zwischen 3 und 10 nm. Diese Daten belegen, dass es sich bei den von CpG-A gebildeten Komplexen nicht um linear miteinander verbundene CpG-A-Moleküle handelt, sondern dass eine dreidimensionale Verknüpfung vorliegt. Die Länge eines 20 bp ODNs beträgt 6,7 nm. Der Durchmesser der CpG-A-Partikel liegt zwischen 40 und 60 nm. Dem untenstehenden Modell zufolge (Abb. 4.8) könnten in einem Partikel näherungsweise 20 bis 40 CpG-A-Moleküle enthalten sein. Diese Hypothese korreliert mit dem Befund von Marshall, der die Struktur des CpG-ODNs D19 mittels Gelpermeationschromatographie untersuchte [Marshall 2003]. D19 gehört ebenso wie CpG-A zur Klasse A, weist jedoch im Gegensatz zu CpG-A nur ein Poly-G-Motiv auf. CpG-ODN D19 bildet wie CpG-A ein heterogenes Gemisch von Sekundärstrukturen und höhermolekularen Komplexen, die bis zu 30 ODN-Moleküle enthalten.

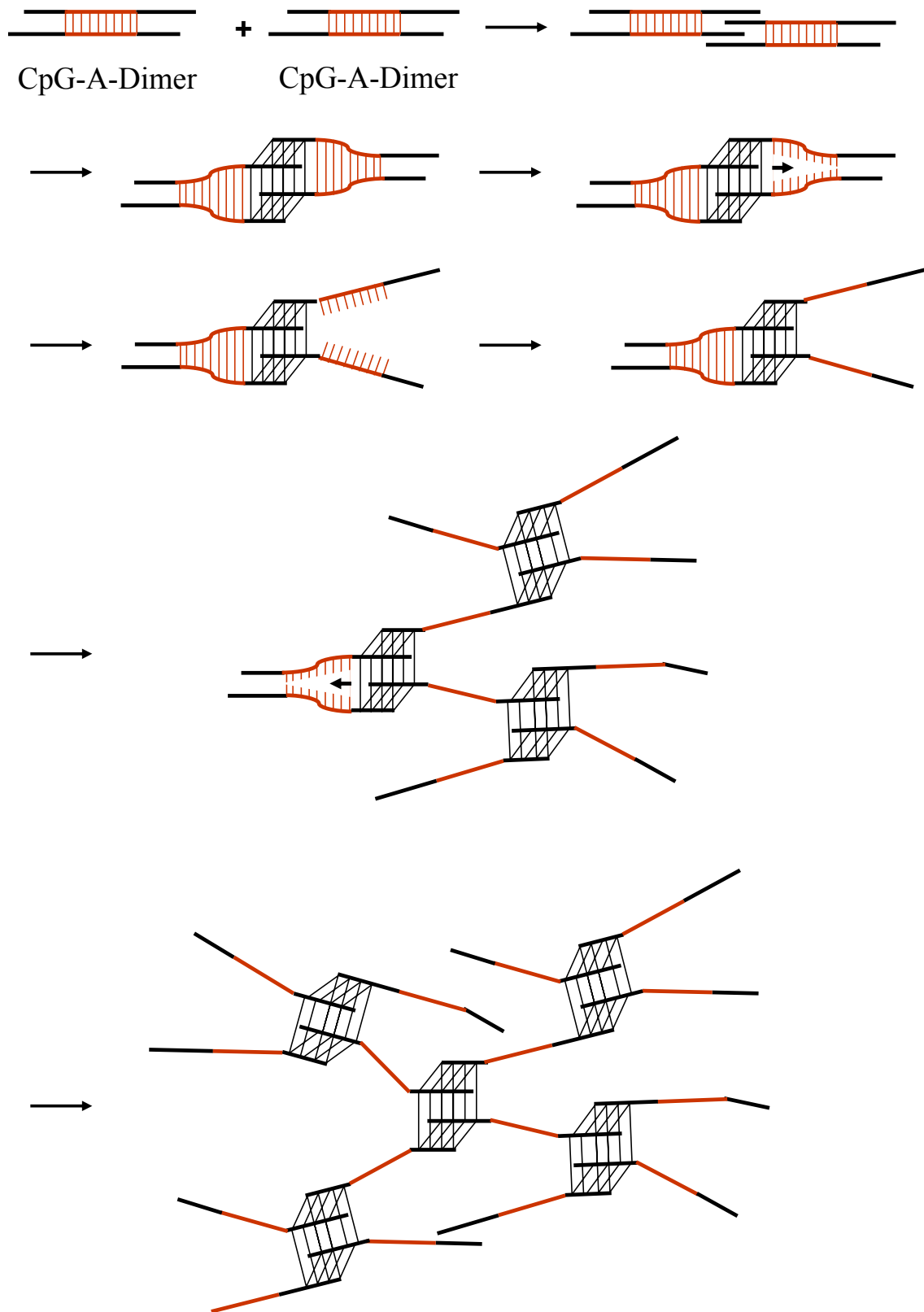


**Abb. 4.8:** Dimensionen von CpG-A-basierten Komplexen.

Die Tatsache, dass Watson-Crick-Basenpaarung die stabilere und dominierende Bindungsform unter physiologischen Bedingungen ist [Phan 2002], lässt die Vermutung zu, dass die Dimerisierung der initiale Schritt der Komplexgenese ist. Ob die Koexistenz von Watson-Crick-Basenpaarung und Hoogsteen-Bindungen in unmittelbarer Nachbarschaft möglich ist, ist fraglich: Erstens, weil die Höhe einer G-Tetrade 2,8 nm beträgt und die Höhe von doppelsträngiger DNA nur 2 nm; Zweitens, weil die Orientierung der Basen zueinander bei der Hoogsteen-Bindung und der Watson-Crick-Basenpaarung nicht identisch ist.

Das untenstehende Modell (Abb. 4.9) zeigt die mögliche Genese der CpG-A-basierten Komplexe und beruht auf dem Grundgedanken, dass Watson-Crick-Basenpaarung und Hoogsteen-Bindungen nicht nebeneinander existieren können. Demnach ist die Dimerisierung der initiale Schritt der Komplexgenese, der die anschließende G-Tetradenbildung schient. Fraglich ist, ob die Watson-Crick-Bindung aufbricht um die G-Tetradenbildung zu ermöglichen oder ob, wie in Abb. 4.7 zu sehen, die Watson-Crick-Bindung erhalten bleibt und die G-Tetradenbildung an den freien Enden der dimerisierten ODN-Einzelstränge stattfindet.

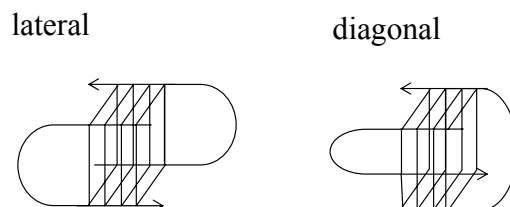
Um eine definitive Aussage über den exakten Aufbau und die Genese der CpG-A-basierten Partikel treffen zu können, müssen andere Methoden hinzugezogen werden, wie zum Beispiel die Röntgenstrukturanalyse. Da CpG-A jedoch eine heterogene Lösung darstellt, müssten für die Röntgenstrukturanalyse alle in Lösung befindlichen CpG-A-Komplexe auskristallisiert werden.



**Abb. 4.9:** Modell der Komplexbildung von CpG-A-basierten Partikeln.

## 4.2.3 Vergleich mit der Literatur

Die Fähigkeit, Guanin-reicher Oligonukleotide Polymere zu bilden, ist seit über 40 Jahren bekannt und wird auf die G-Tetradenbildung von vier Guanin-Molekülen zurückgeführt [Gellert 1962]. Das Interesse an diesen Strukturen nahm in den letzten Jahrzehnten stetig zu, seit deren biologische Bedeutung entdeckt wurde. Guanin-reiche Sequenzen finden sich in wichtigen Regionen des Genoms, wie Telomeren [Blackburn 1994], Immunglobulin-Switch Regionen [Sen 1988] und Gen-Promotor-Regionen [Gilbert 1999; Keniry 2000]. Sen et al. untersuchten mehrere Guanin-reiche DNA-Sequenzen und stellten fest, dass schon drei Guanin-Moleküle in Folge ausreichen, um stabile G4-Tetraden zu bilden [Sen 1990]. Jede neue Studie über die Struktur Guanin-reicher Sequenzen vermittelt den Eindruck, dass diese einem außerordentlichen Polymorphismus unterliegt. G-Tetraden können klassifiziert werden durch die Anzahl und die Anordnung der Einzelstränge (parallel oder antiparallel), die Konformation der Guanin-Basen (anti oder syn) sowie, falls vorhanden, die Orientierung der *Hairpin loops* (lateral oder diagonal siehe Abb. 4.10). Gefaltete Strukturen werden kinetisch begünstigt, höhermolekulare Strukturen bilden sich insbesondere bei hohen DNA- und Salzkonzentrationen.



**Abb. 4.10:** Laterale oder diagonale Orientierung von *Hairpin loops*.

Viele Faktoren können die G-Tetraden-vermittelte Komplexbildung beeinflussen, wie z.B. die Ionenkonzentration, die Länge und die Anzahl der Guanin-reichen Segmente, die Länge und Sequenz der nicht Guanin-haltigen Segmente sowie die Möglichkeit zu Watson-Crick-Basenpaarung [Keniry 2000].

Guanin-reiche Oligonukleotide mit zwei Poly-G-Motiven, wie CpG-A, können in Abhängigkeit von DNA- und Salzkonzentrationen intra- oder intermolekulare G-Tetraden ausbilden. Intramolekulare G-Tetraden führen zur Entstehung von Hairpin-Dimer Struk-

turen, wohingegen intermolekulare G-Tetraden zur Bildung von *G-wire*-Strukturen führen können [Marsh 1995]. Die bis dato in der Literatur beschriebenen Guanin-reichen Oligonukleotide unterscheiden sich von CpG-A dadurch, dass sie keine Palindromsequenz aufweisen. Keines der in der Literatur beschriebenen Guanin-reichen Oligonukleotide bildet stabile Komplexe unter physiologischen Salzkonzentrationen [Basu 1997; Benimetskaya 1997]. Die Koexistenz von zwei Poly-G-Motiven und einer zentralen Palindromsequenz scheint die Komplexbildung zu katalysieren, auch wenn keine hohen Salzkonzentrationen vorliegen. Das ODN CpG-A besitzt daher im Gegensatz zu anderen Guanin-reichen Oligonukleotiden ohne Palindrom die Fähigkeit, unter physiologischen Bedingungen Nukleinsäure-basierte Partikel zu bilden.

Untersuchungen mit zwei komplementären Oligonukleotiden, die einerseits die Fähigkeit zur Dimerisierung und andererseits die Fähigkeit zur G-Tetradenbildung aufwiesen, zeigten, dass das Dimer und somit Watson-Crick-Basenpaarung die dominierende Bindungsform (höhere Stabilität) unter physiologischen Bedingungen ist, G-Tetraden hingegen bevorzugt in Gegenwart hoher Kaliumkonzentrationen und bei niedrigem pH-Wert gebildet werden [Phan 2002; Alberti 2003]. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass

1. bei diesen Versuchen das Dimer aus 15 bis 20 Basenpaaren bestand (im Gegensatz zu 10 bp bei CpG-A). Es ist bekannt, dass die Stabilität des Dimers mit der Anzahl der beteiligten Basen zunimmt [Alberti 2003].
2. die G-Tetraden-basierten Komplexe nur drei G-Tetraden enthielten (im Gegensatz zu vier G-Tetraden bei CpG-A). Mit zunehmender Anzahl der an einem G-Tetraden-Komplex beteiligten G-Tetraden nimmt die Stabilität zu.

Aus den vorliegenden Literaturdaten können zwar Gesetzmäßigkeiten abgeleitet werden, ob diese jedoch auf CpG-A übertragen werden können ist fraglich. Alle in der Literatur diskutierten Sequenzen unterscheiden sich von CpG-A. Um Gewissheit über die Komplexbildung von CpG-A zu erlangen, müssten weitere Analysemethoden verwendet werden.

Marshall et al. untersuchten die Struktur des CpG-ODNs D19 mittels Gelpermeationschromatographie [Marshall 2003]. D19 gehört ebenso wie CpG-A zur Klasse A der CpG-ODN (Sequenz von D19: 5'-GGTgcatgcatgagGGGG-3'). Im Gegensatz zu CpG-A ist das Palindrom von D19 zwei Basen länger und die Poly-G-Sequenz am

5'Ende auf 2 Guanin-Basen verkürzt. Es ist anzunehmen, dass die G-Tetradenbildung des ODNs D19 bevorzugt am 3'-Ende stattfindet, wohingegen bei CpG-A beide Enden zur G-Tetradenbildung zur Verfügung stehen. Marshall et al. berichtet, dass CpG-ODN D19 ein heterogenes Gemisch von Sekundärstrukturen bildet und die größeren Komplexe bis zu 30 Oligonukleotid-Moleküle beinhalten. Vergleiche mit einem Oligonukleotid ohne Poly-G-Motive machen deutlich, dass die Komplexbildung G-Tetraden vermittelt ist. Vergleiche mit Kontroll-ODN ohne Palindrom fehlen jedoch. Die von Marshall verwendete Gelpermeationschromatographie liefert nur beschränkte Information über das Aussehen und die Form der Komplexe. Sie kann allerdings genaueren Aufschluss darüber geben, wie viele Moleküle an der Komplexbildung beteiligt sind und wäre daher ein wertvolles Instrument für die Analyse der CpG-A-basierten Komplexe. Neben Palindrom und Poly-G-Motiv am 3'-Ende verfügt CpG-A im Gegensatz zu D19 noch über ein weiteres Poly-G-Motiv am 5'-Ende. Hierdurch bietet sich eine erhöhte Zahl an Kombinationsmöglichkeiten. Die hier erhobenen Daten machen insbesondere die Bedeutung des Palindroms klar, die von Marshall nicht näher untersucht wurde.

Guanin-reiche Sequenzen finden sich in biologisch bedeutenden Regionen des Genoms [Keniry 2000]. G-Tetraden können spezifisch von zellulären Proteinen wie z.B. der menschlichen Telomerase oder der HIV-Integrase erkannt werden. Ausgehend von diesem Befund wurden G-Tetraden-bildende Oligonukleotide als Inhibitoren der Telomerase [Mergny 2001] und auch der HIV-Integrase entwickelt [Jing 1997; Jing 2000a; Jing 2000b; Jing 2001; Jing 2002].

Die Dimerisierung von RNA ist ein lebenswichtiger Prozess für die Replikation von Retroviren. Für die Dimerisierung des HIV-1-Genoms ist die Ausbildung von G-Tetraden notwendig [Sundquist 1993]. Eine Guanin-reiche Sequenz und die Existenz eines Palindroms sind erforderlich für die Dimerisierung des *Moloney murine sarcoma* Viruses [Ly 1999]. CpG-A induziert ein Zytokinprofil, das Ähnlichkeiten mit dem Zytokinprofil nach einer viralen Infektion aufweist. CpG-A scheint somit Charakteristika aufzuweisen, die von der plasmazytoiden dendritischen Zelle als Virus-assoziiertes Signal interpretiert werden. Die oben angeführten Beispiele zeigen, dass Palindrom und G-Tetraden, die die Komplexbildung von CpG-A bedingen, auch in der viralen Replikation eine wichtige Rolle spielen. Ebenso wie bakterielle DNA, weist die DNA von einigen Viren unmethylierte CG-Dinukleotide mit einer gesteigerten Häufigkeit von 1/16



auf [Karlin 1994]. Die PDC, als die IFN-produzierende Zelle des Körpers, ist auf die Erkennung von Viren spezialisiert. Sie ist wahrscheinlich in der Lage, eine Vielzahl von Virus-assoziierten Signalen wie G-Tetraden, Palindrom, CpG-Motiv und Partikelcharakter zu erkennen, um die Typ I IFN-Synthese zu aktivieren.

### 4.3 Unterschiedliche Wirkung von CpG-A und CpG-B

#### 4.3.1 Methodendiskussion

##### Herstellung und Beladung der Nanopartikel:

Ein optimales Nanopartikelsystem sollte über eine homogene Größenverteilung, eine hohe Beladungskapazität und eine hohe Stabilität verfügen. Ziel war es, Nanopartikelsysteme zu schaffen, die diesen Anforderungen genügen. Bei der Herstellung der Partikel wurden Parameter wie das Mischungsverhältnis von Oligonukleotid zu Protamin und die Inkubationszeit variiert, um eine optimale Größenverteilung und Stabilität zu erreichen. Außerdem sollte die Größe so gering wie möglich sein, um dem biologischen Pendant, den CpG-A-Komplexen, so nahe wie möglich zu kommen.

Bei der Beladung der Polystyrolnanopartikel wurden lediglich 35-67 % der eingesetzten Menge an Oligonukleotid gebunden; daher war es hier notwendig, das ungebundene Oligonukleotid durch Zentrifugation zu entfernen. Bei der Herstellung der Partikel hingegen werden 95 % der eingesetzten ODN-Menge gebunden [Junghans 2000]. Das Entfernen der überschüssigen ODN-Menge ist daher nicht notwendig. Außerdem wird durch das Zentrifugieren die Stabilität der Partikel beeinträchtigt.

##### Aufnahme von Nanopartikeln:

Untersucht man die zelluläre Aufnahme von Oligonukleotiden und den Effekt von Trägersystemen auf diese Aufnahme, so wird in der Regel die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Zelle nach Inkubation mit FITC-ODN oder mit FITC-ODN gebunden an das Trägersystem verglichen. Dieser direkte Vergleich war hier jedoch nicht möglich, da die Bindung von FITC-ODN an Nanopartikel die Fluoreszenz veränderte. Bei der Partikelbildung mit FITC-ODN konnte man eine Farbveränderung von gelb nach rot

beobachten, die auch in der Literatur beschrieben wurde [Junghans 2000]. Durch die Bindung von FITC-ODN an Polystyrolnanopartikel war ebenfalls eine Verschiebung der Fluoreszenz detektierbar. Um dennoch eine Aussage über die Aufnahme treffen zu können, wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der Probe (MFI) nach Inkubation bei 4°C und bei 37°C verglichen. Bei 4°C findet bekanntlich keine Endozytose statt, deshalb dient die Inkubation bei 4°C als Negativkontrolle für Aufnahmeversuche mit Oligonukleotiden.

### Versuche mit dem BDCA-2-Antikörper:

Der hier verwendete monoklonale BDCA-2-Antikörper und der Kontroll-Antikörper gegen BDCA-1 waren in einer Natriumazid-haltigen Lösung suspendiert. In Vorversuchen zeigte sich, dass Natriumazid die IFN- $\alpha$ -Synthese in plasmazytoiden dendritischen Zellen unspezifisch hemmt. Beide Antikörper waren nicht erhältlich in einer Natriumazid-freien Lösung und eine Entfernung des Natriumazids aus der Antikörperlösung gestaltet sich als äußerst schwierig. Um die unspezifische Hemmung der IFN- $\alpha$ -Synthese durch Natriumazid zu umgehen, wurde die Antikörperlösung so kurz wie möglich in Kontakt mit den Zellen gebracht. Letztendlich erwies sich eine 20-minütige Inkubation der Zellen mit der Antikörperlösung und ein anschließender Waschschrift als optimal. Dieser Zeitrahmen war ausreichend, um eine spezifische Wirkung der Antikörper zu erzielen und eine unspezifische Wirkung des Natriumazids zu verhindern.

### 4.3.2 Diskussion der Ergebnisse im Horizont der Literatur

#### Struktur-Wirkungs-Beziehung:

Der markanteste Unterschied der beiden CpG-Klassen bezüglich ihrer Wirkung auf plasmazytoide dendritische Zellen besteht in der Induktion der IFN- $\alpha$ -Produktion. CpG-ODN und Imidazoquinoline sind die einzigen derzeit bekannten Moleküle, die eine IFN- $\alpha$ -Synthese in PDCs hervorrufen können [Krug 2001a; Ito 2002]. Allerdings ist die Menge an IFN- $\alpha$ , die durch Imidazoquinoline oder die meisten CpG-Oligonukleotide induziert wird, eher gering. CpG-A ist das einzige bekannte Molekül, das die Fähigkeit besitzt, eine maximale IFN- $\alpha$ -Produktion in plasmazytoiden dendritischen Zellen hervorzurufen [Krug 2001a]. Äquivalent hohe Mengen an IFN- $\alpha$  wurden bis dato nur nach viraler Infektion von PDCs detektiert. Somit scheint CpG-A ein Charakteristikum auf-

zuweisen, welches weder anderen CpG-ODN noch den Imidazoquinolinen zu Eigen ist. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass CpG-A aufgrund der Koexistenz von Palindrom und Poly-G-Motiven die Eigenschaft besitzt, höhermolekulare Komplexe zu bilden. Die Hypothese liegt nahe, dass für den Parameter IFN- $\alpha$  ein Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung besteht. Folgende Befunde unterstützen diese Hypothese:

1. Die Inhibition der G-Tetradenbildung von CpG-ODN der Klasse A durch Deaza-Modifikation am Guanin hemmt deren Kapazität, IFN- $\alpha$  zu induzieren [Krug 2001a]. Ebenso führte, wie hier gezeigt, eine Substitution der Guanin-Moleküle am 3'- und 5'-Ende durch Cytosin-Moleküle zu einem Verlust der Fähigkeit, hohe Mengen an IFN- $\alpha$  zu induzieren. Die Guanin-Moleküle am 3'- und 5'-Ende von CpG-A sind verantwortlich für die G-Tetraden vermittelte Bildung höhermolekularer Strukturen. Der Verlust des zentralen Palindroms führte zu einer reduzierten Komplexbildung und auch zu einer verringerten IFN- $\alpha$ -Produktion in PDCs (siehe 3.1 und 3.2). Diese Befunde machen deutlich, dass eine Hemmung der Komplexbildung von CpG-A einhergeht mit einem Verlust der Fähigkeit, IFN- $\alpha$  zu induzieren.

2. Verleiht man CpG-B durch die Bindung an Nanopartikel eine partikuläre Struktur, so induziert dieses wie CpG-A eine maximale IFN- $\alpha$ -Produktion in plasmazytoiden dendritischen Zellen. Die Steigerung der IFN- $\alpha$ -Induktion von CpG-B durch die Bindung an Nanopartikel ist nicht mit einer gesteigerten Aufnahme korrelierbar. Die Synthese anderer Zytokine wie TNF- $\alpha$  wird geringfügig gesteigert, jedoch nicht in dem Ausmaß wie die IFN- $\alpha$ -Produktion. Es scheint also, dass der partikuläre Charakter der CpG-Oligonukleotide selektiv den Parameter IFN- $\alpha$  beeinflusst.

An Nanopartikel gebundene GC-Kontroll-Oligonukleotide, die kein CpG-Motiv enthalten, induzieren kein IFN- $\alpha$ . Die GC-Kontrolle zu CpG-A (ODN 2243) verfügt ebenfalls über ein zentrales Palindrom und Poly-G-Motive, ruft jedoch keine IFN- $\alpha$ -Produktion in PDCs hervor. Mit Hilfe der Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass dieses Oligonukleotid auch die Fähigkeit besitzt, multi-molekulare Komplexe zu bilden (eigener Befund, der nicht in dieser Dissertation vorgestellt wurde). Das CpG-Motiv ist also ein notwendiges Signal, um die Induktion von IFN- $\alpha$  in PDCs hervorzurufen. Wird das CpG-Motiv in partikulärer Form präsentiert, so führt dies zu einer Signalverstärkung.

Magnusson stellte fest, dass CpG-enthaltende Plasmid-DNA nur in Kombination mit Lipofektin hohe Mengen an IFN- $\alpha$  im Vollblut von Schweinen induzierte [Magnusson 2001a]. Die IL-6-Produktion wurde im Gegensatz dazu nicht gesteigert. Er führte dieses auf die durch Lipofektin gesteigerte Aufnahme der ODN zurück, nicht jedoch auf deren partikulären Charakter. Lipofektin ist ein kationisches Lipid, das zur Transfektion von Zellen verwendet wird. Für die entstehenden Aggregate aus ODN und Lipofektin wurde der Begriff „*spaghetti meatball assemblies*“ geprägt [Ly 1999]. Kürzlich zeigten Fearon et al., dass die Bindung kurzer CpG-ODN an Mikropartikel zu einer hohen Induktion von IFN- $\alpha$  in PDCs führte, die allerdings mit einer gesteigerten Aufnahme in die Zelle verbunden war [Fearon 2003].

Eine mögliche Erklärung für die Signalverstärkung durch die Präsentation von CpG-Motiven in Form eines Partikels ist das *Clustering* von Rezeptoren. Seit der Entdeckung der immunologischen Synapse [Monks 1998] steht fest, dass die Vermittlung der Wirkung durch ein einzelnes Rezeptor-Molekül in vielen Fällen ein vereinfachtes Modell ist. Mehrere Rezeptoren können sich in der Zellmembran in Bereichen, die als „*Lipid rafts*“ bezeichnet werden, ansammeln [Pralle 2000]. Diese Konzentration von Rezeptor-Molekülen in Mikrodomänen der Zellmembran wird als *Clustering* bezeichnet und kann zu einer verstärkten Signaltransduktion führen [Vereb 2000]. Durch die Bildung von partikulären Strukturen werden mehrere CpG-Moleküle in räumlicher Nähe präsentiert und können mehrere Rezeptoren binden. Eine erhöhte Anzahl an Rezeptor-Ligand-Kontakten führt zu einem verstärkten Signal. Mehrere Studien haben bereits die Bedeutung von *Lipid rafts* in der angeborenen Immunantwort deutlich gemacht; so wird z.B. die MHC-abhängige T-Zell-Aktivierung über das Clustering von Rezeptoren in *Lipid rafts* verstärkt [Romagnoli 1997; Xavier 1998].

Das Clustering von Rezeptoren begründet die Signalverstärkung, nicht jedoch die selektive Beeinflussung der IFN- $\alpha$ -Synthese. Weder in PBMCs noch in PDCs wurde die Synthese anderer Zytokine oder Chemokine wie z.B. von TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 derart gesteigert wie die IFN- $\alpha$ -Produktion (eigene nicht gezeigte Daten). Fraglich ist, warum nur die Synthese bestimmter Zytokine durch vermehrte Rezeptor-Ligand-Kontakte amplifiziert werden sollte. IFN- $\alpha$  nimmt eine Sonderstellung unter den Zytokinen ein, da es neben der Funktion als Zytokin, eine direkte antivirale Wirkung besitzt. Zudem ist IFN- $\alpha$  ein spezifischer biologischer Marker für eine Virusinfektion. Kein anderes Zyto-

kin kann konkret und ausschließlich einer bestimmten Infektion oder einem bestimmten Erregertyp zugeordnet werden. Dass die Synthese von IFN- $\alpha$  anders gesteuert wird als die Synthese anderer Zytokine kann evtl. auf die Sonderstellung von IFN- $\alpha$  zurückgeführt werden. Aus Sicht der Evolution wäre dies ein effizienter Mechanismus des menschlichen Körpers schnell und selektiv auf eine virale Infektion zu reagieren.

### Nanopartikel:

Der Einsatz von Polystyrolnanopartikeln erwies sich verglichen mit dem Einsatz von Protikeln als potenter. Die mit CpG-ODN-beladenen Nanopartikel wurden so eingesetzt, dass die ODN-Konzentration pro *Well* 3  $\mu\text{g/ml}$  betrug. Nicht berücksichtigt wurde jedoch die Tatsache, dass die Polystyrolnanopartikel eine niedrigere Beladungskapazität als die Protikel aufweisen. Für die Polystyrolnanopartikel beträgt die Beladungskapazität 2,7  $\mu\text{mol}$  ODN pro Gramm Nanopartikel und für die Protikel 137  $\mu\text{mol}$  ODN pro Gramm Protamin. Beim Einsatz der Polystyrolnanopartikel werden pro *Well* 62,5  $\mu\text{g}$  Nanopartikel eingesetzt, wohingegen bei den Protikeln pro *Well* nur 1,2  $\mu\text{g}$  Protamin eingesetzt werden. Diese Menge an Protamin entspricht ungefähr 1,8  $\mu\text{g}$  Protikeln pro *Well*. Diese Daten verdeutlichen, dass beim Einsatz der Polystyrolnanopartikel mehr Partikel pro *Well* eingesetzt werden als bei den Protikeln. Die pro *Well* eingesetzte Menge an Oligonukleotid hingegen ist bei beiden Nanopartikelarten gleich. Jedoch werden bei den Polystyrolnanopartikeln alle Oligonukleotide an die Oberfläche der Nanopartikel gebunden und können direkte Rezeptor-Ligand Bindungen eingehen [Fritz 1997]. Bei den Protikeln hingegen wird der größte Teil der Oligonukleotide (schätzungsweise 90 %) in den Partikel eingeschlossen. Außerdem werden die eingeschlossenen Oligonukleotide nur verzögert freigesetzt: 8 % innerhalb der ersten 24 Stunden [Junghans 2000]. Somit steht bei den Protikeln in den ersten 48 Stunden nur ein recht geringer Teil der Oligonukleotide zur Bindung an einen Rezeptor zur Verfügung. Daher ist es erstaunlich, dass trotzdem eine erhebliche Steigerung der IFN- $\alpha$ -Produktion erreicht werden konnte. Die Desorptionsrate der Oligonukleotide von den positiv geladenen Polystyrolnanopartikeln ist ebenfalls sehr gering. Bei pH 7 werden innerhalb der ersten 24 Stunden nur 7,5 % des Oligonukleotides freigesetzt [Fritz 1997]. Im Gegensatz zu den Protikeln befinden sich die Oligonukleotide hier jedoch alle an der Partikeloberfläche und können somit von Rezeptoren erkannt werden. Eine Desorption ist daher im Falle der Polystyrolnanopartikel eher unerwünscht.

Polystyrolnanopartikel tragen im Gegensatz zu Protikeln Poloxamer-Ketten an ihrer Oberfläche (*Stealth* Technologie, siehe Kapitel 1.5). Gursel untersuchte die immunstimulatorische Wirkung von CpG-ODN-beladenen Liposomen *in vitro* und zeigte, dass *Stealth*-Liposomen normalen kationischen Liposomen bezüglich ihrer Potenz, Makrophagen zu aktivieren, überlegen waren [Gursel 2001]. Die Versuche mit Kontroll-ODN beladenen Nanopartikeln zeigen, dass die Poloxamer-Ketten alleine keine immunstimulatorische Wirkung besitzen. Poloxamer-Ketten können jedoch die Adsorption von Serumproteinen verhindern und somit die Stabilität der Nanopartikel in der Zellkultur erhöhen.

Die Überlegenheit der Polystyrolnanopartikel kann zurückgeführt werden auf 1. den höheren Anteil an zur Rezeptorbindung verfügbarem CpG-ODN, 2. die höhere Anzahl an Partikeln pro *Well* und 3. die Existenz von Poloxamer-Ketten. Ein Nachteil der Polystyrolnanopartikel ist jedoch die Tatsache, dass Polystyrol ein nicht-bioabbaubares Polymer ist und daher nur bedingt für medizinische Zwecke verwendbar ist, da es vom Körper nicht abgebaut werden kann. Ein Vorteil ist, dass sich keine toxischen Abbauprodukte bilden, die zum Teil bei der Degradierung bioabbaubarer Polymere entstehen können. Zielsetzung für zukünftige Projekte wäre die Synthese von bioabbaubaren Nanopartikeln mit positiver Oberflächenladung. Versuche mit positiv geladenen Polyhexylcyanoacrylat-Nanopartikeln waren nicht erfolgreich, da dieses bioabbaubare Polymer toxisch für die Zellen war (Ergebnisse wurden erhoben, aber nicht in dieser Arbeit vorgestellt). Untersuchungen mit Gelatine-Nanopartikeln sind Gegenstand aktueller Forschung.

Durch die Bindung von CpG-A an Nanopartikel konnte keine Steigerung der IFN- $\alpha$ -Produktion erreicht werden. Dies ist damit zu erklären, dass die durch CpG-A induzierte Menge an IFN- $\alpha$  nicht mehr gesteigert werden kann, da sie der maximalen Menge an IFN- $\alpha$  entspricht, die von einer PDC produziert werden kann [Krug 2001a]. Zudem liegt CpG-A bereits in partikulärer Form vor. Durch die Bindung an Nanopartikel entstehen noch größere Partikel, die wahrscheinlich zu groß sind, um ein optimales Signal zu liefern.

Neben den hier vorgestellten qualitativen Veränderungen der Wirkung von CpG-ODN durch Bindung an Nanopartikel, wurde eine Verstärkung der CpG-Wirkung *in vivo* durch den Einsatz von partikulären Trägersystemen beschrieben [Gursel 2001; Mui 2001; Diwan 2002]. Einerseits ist dies zurückzuführen auf die erhöhte Stabilität der Oligonukleotide durch die Bindung an das partikuläre Trägersystem. Die Oligonukleotide werden vor Degradierung geschützt, wodurch eine längere Halbwertszeit und eine höhere Bioverfügbarkeit erzielt wird [Lambert 2001a]. Andererseits kann durch die systemische Verabreichung der CpG-Oligonukleotide in Partikelform eine gezielte Aufnahme in bestimmte Organe erreicht werden (*Drug targeting*, siehe Kapitel 1.1.4): Die i.v. Applikation von *Stealth*-Nanopartikeln führt zu einer Anreicherung in Geweben mit gefenstertem oder geschädigtem Endothel. *Non-Stealth*-Nanopartikel hingegen werden bevorzugt vom mononukleären phagozytären System aufgenommen und reichern sich insbesondere in Leber, Milz, Lunge und Knochenmark an [Moghimi 2001; Brigger 2002].

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Anwendung der partikulären Trägersysteme als Vakzineadjuvans. Hier bietet sich die Möglichkeit, CpG-Oligonukleotide und Antigen an einen Partikel zu binden und dadurch beide Agenzien in räumliche Nähe zu bringen und deren Wirkung erheblich zu steigern. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von CpG-ODN und Tetanustoxoid an bioabbaubare Nanopartikel die Immunantwort in einem murinen Vakzinierungsmodell signifikant verbessert werden konnte im Vergleich zur separaten Administration der beiden Agenzien [Diwan 2002]. Ähnliche Ergebnisse erzielte Gursel durch die Beladung von *Stealth*-Liposomen mit Antigen und CpG-ODN [Gursel 2001]. Neben den bekannten Vorteilen der partikulären Wirkstoffträgersysteme wird durch die hier vorliegende Arbeit ein neuer Aspekt deutlich: Durch die Präsentation der CpG-Motive in Partikelform wird spezifisch die IFN- $\alpha$ -Produktion der plasmazytoiden dendritischen Zellen gefördert.

### Aufnahme durch plasmazytoide dendritische Zellen:

Die verschiedenen Lymphozytenpopulationen unterscheiden sich in ihrer Kapazität, Oligonukleotide aufzunehmen. Zur Oligonukleotid-Aufnahme in plasmazytoide dendritische Zellen liegen bis dato kaum Daten vor. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aufnahme von Oligonukleotiden und ODN-beladenen Nanopartikeln durch plasmazytoide dendritische Zellen äußerst gering ist. Durch die Kopplung von CpG-ODN an Nanopar-

tikel wird die ODN-Aufnahme in diesen Zelltyp kaum gesteigert. Die Potenzierung der IFN- $\alpha$ -Synthese durch Bindung von CpG-B an Nanopartikel ist somit nicht mit einer gesteigerten Aufnahme korrelierbar.

Die erhobenen Daten machen deutlich, dass plasmazytoide dendritische Zellen die Fähigkeit besitzen, Nanopartikel bis zu einer Größe von 250 nm aufzunehmen. Sandberg definierte PDCs als nicht-phagozytäre Zellen, da sie nicht in der Lage waren, Partikel mit einem Durchmesser von 1,86  $\mu\text{m}$  aufzunehmen [Sandberg 1990]. Per definitionem spricht man von Phagozytose ab einer Größe von 1  $\mu\text{m}$ . Somit scheint die PDC zwar nicht zur Phagozytose, aber doch zur Endozytose von kleinen Partikeln befähigt zu sein.

CpG-A und CpG-B unterscheiden sich kaum in ihrer Aufnahme in plasmazytoide dendritische Zellen. Dieser Befund entkräftigt die Hypothese, dass die unterschiedlichen immunstimulatorischen Wirkungen der beiden CpG-ODN-Klassen in PDCs auf die Menge an aufgenommenem CpG-ODN zurückgeführt werden können. Zahlreiche Gruppen beschreiben, dass Guanin-reiche Oligonukleotide durch Scavenger-Rezeptoren auf den Zellen erkannt werden und daher besser als andere Oligonukleotide in die Zelle aufgenommen werden [Dalpke 2002]. Jedoch wurde die gesteigerte Aufnahme von Guanin-reichen Oligonukleotiden via Scavenger-Rezeptoren nur für Makrophagen, Monozyten und murine CD11c-positive Milz DCs beschrieben [Lee 2000; Gursel 2002]. Für plasmazytoide dendritische Zellen hingegen wurde die Existenz solcher Scavenger-Rezeptoren noch nicht nachgewiesen. Auf quantitativer Ebene besteht kein Unterschied zwischen der Aufnahme von CpG-A und CpG-B. Es ist jedoch anzunehmen, dass ein qualitativer Unterschied besteht und die beiden CpG-ODN-Typen aufgrund der Erkennung durch unterschiedliche Rezeptoren in verschiedene Endosomen gelangen, eine Fragestellung, die in zukünftigen Projekten mittels Konfokalmikroskopie untersucht werden sollte.

### Regulation der Typ I IFN-Synthese in plasmazytoiden dendritischen Zellen:

Die Bedeutung des Typ I IFN-Rezeptors in der Regulation der Typ I IFN-Synthese wird in der Literatur kontrovers diskutiert (siehe Einleitung 1.3). Das herrschende Konzept basiert auf der Annahme, dass in der frühen Phase gebildetes Typ I IFN (insbesondere IFN- $\beta$ ) den Typ I IFN-Rezeptor aktiviert, welches zur Phosphorylierung und nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors IRF-7 führt. Die Aktivierung von IRF-7 leitet



die Synthese von „spätem“ IFN- $\alpha$  ein. Diese Erkenntnisse beruhen auf Versuchen mit murinen Fibroblasten und humanen myeloiden DCs [Marie 1998; Sato 1998; Remoli 2002]. Die Identifikation der plasmazytoiden dendritischen Zelle als der IFN-produzierenden Zelle, eröffnete neue Möglichkeiten, die Signaltransduktion und Entstehung von Typ I IFN in den Hauptproduzenten von Typ I IFN zu untersuchen. Barchet widersprach als Erster dem herkömmlichen Konzept und zeigte, dass murine PDCs es vermögen, unabhängig vom Typ I IFN-Rezeptor-Signalling, hohe Mengen an IFN- $\alpha$  in einer frühen Phase zu bilden [Barchet 2002]. Takauji bewies als Erster für humane PDCs, dass diese IRF-7 konstitutiv exprimieren und die Expression von IRF-7 unabhängig vom Typ I IFN-Rezeptor ist [Takauji 2002].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Rückkopplungsmechanismus über den Typ I IFN-Rezeptor das Ausmaß der Typ I IFN-Produktion bestimmt, dass jedoch auch große Mengen an Typ I IFN unabhängig von diesem Rückkopplungsmechanismus produziert werden können. Ungefähr die Hälfte der von CpG-A induzierten Menge an IFN- $\alpha$  wird unabhängig vom Typ I IFN-Rezeptor synthetisiert. Dieser Befund bestätigt die Aussage von Barchet, dass hohe Mengen an IFN- $\alpha$  unabhängig vom Typ I IFN-Rezeptor produziert werden können und widerspricht somit dem herkömmlichen Modell der Typ I IFN-Synthese. Es ist wahrscheinlich, dass in PDCs die Typ I IFN-Produktion anders reguliert wird als in murinen Fibroblasten und myeloiden DCs.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass abhängig von der Art des Stimulus die Typ I IFN-Synthese in PDCs durch zwei unterschiedliche Signalwege initiiert werden kann:

1. unabhängig vom Typ I IFN-Rezeptor: CpG-B induziert die Typ I IFN-Synthese unabhängig vom Typ I IFN-Rezeptor.
2. abhängig vom Typ I IFN-Rezeptor: CpG-A aktiviert den Typ I IFN-Rezeptor und induziert hohe Mengen an Typ I IFN.

Diese Daten belegen zum ersten Mal die Existenz von zwei unterschiedlichen Signalwegen der Typ I IFN-Induktion in PDCs. CpG-A und CpG-B können somit als Modellstimuli dienen, um diese beiden Wege der Typ I IFN-Synthese zu aktivieren. Da CpG-B sehr geringe Mengen an Typ I IFN induziert, stellt sich jedoch die Frage, ob die Aktivierung des Typ I IFN-Rezeptors abhängig ist von dem Vorliegen einer bestimmten

Konzentration an Typ I IFN. Durch die Kombination der Stimuli CpG-B und CD40-Ligand kann die IFN- $\alpha$ -Produktion erheblich gesteigert werden und erreicht ein vergleichbares Ausmaß wie nach Stimulation mit CpG-A. Dennoch führt diese Steigerung der CpG-B-vermittelten IFN- $\alpha$ -Synthese nicht zur Aktivierung des Typ I IFN-Rezeptors [Kerkmann 2003].

### Unterschied zwischen CpG-A und CpG-B:

CpG-B ist der potentere Stimulus für die Parameter, die unabhängig vom Typ I IFN-Rezeptor sind, wie die IL-8-Produktion und die Aktivierung der PDC. CpG-A hingegen ist aktiver bezüglich der Typ I IFN-Rezeptor vermittelten Parameter, wie IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ; ausgenommen TNF- $\alpha$ , für das beide CpG-ODN-Klassen gleich aktiv sind. Der Typ I IFN-Rezeptor abhängige Rückkopplungsmechanismus wird durch ein bis dato unbekanntes Signal aktiviert, welches von CpG-A, nicht jedoch von CpG-B geliefert wird.

Die Identifizierung des Signals, welches den Typ I IFN-Rezeptor abhängigen Signalweg aktiviert und spezifisch für CpG-A ist, sollte zu dem Rezeptor führen, der verantwortlich für die unterschiedliche Wirkung beider CpG-Klassen ist. Dieser Rezeptor müsste in der Signalkaskade oberhalb (*upstream*) des Typ I IFN-Rezeptors und unterhalb (*downstream*) des TLR-9-Rezeptors lokalisiert sein, denn die Aktivität beider CpG-Klassen wird über den TLR-9-Rezeptor vermittelt [Hemmi 2003]. TLR-7 spielt in der Signaltransduktion von CpG-ODN keine Rolle. Wildtyp Mäuse und TLR-7-defiziente Mäuse reagierten gleichermaßen auf eine Stimulation mit CpG-ODN [Hemmi 2002].

Die Aktivierung des TLR-9-Rezeptors führt zu der Aktivierung der PDC und zur Zytokinausschüttung. Ob die Typ I IFN-Rezeptor-abhängige IFN- $\alpha$ -Produktion auch über den TLR-9-Rezeptor vermittelt wird, ist fraglich. Eine Erklärung für den Unterschied zwischen CpG-A und CpG-B kann eine unterschiedliche Affinität der beiden CpG-ODN-Klassen zu dem TLR-9-Rezeptor sein oder die Beteiligung von verschiedenen Chaperonen oder Korezeptoren. Bezüglich der TLR-9-vermittelten Parameter wie IL-8-Produktion und Aktivierung der PDC ist CpG-A der schwächere Stimulus. Es ist möglich, dass aufgrund der partikelartigen Struktur von CpG-A das CpG-Motiv in einer veränderten Konformation vorliegt und nicht mehr optimal in die Bindungstasche des aktiven Zentrums des TLR-9-Rezeptors passt. Somit wäre der Unterschied zwischen

CpG-A und CpG-B dadurch zu erklären, dass CpG-B optimal den TLR-9-Rezeptor aktiviert welches allerdings nicht zu einer Aktivierung des Typ I IFN-Rezeptors führt; CpG-A hingegen ein schlechter Aktivator des TLR-9-Rezeptors ist zusätzlich aber noch den Typ I IFN-Rezeptor aktivieren kann.

Es wurde beschrieben, dass Virus-abhängige Kinasen den Typ I IFN-Rezeptor vermittelten Signalweg über die Phosphorylierung von IRF-3 und IRF-7 triggern [Marie 1998]. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Kinasen I $\kappa$ K $\epsilon$  (I $\kappa$ B Kinase  $\epsilon$ ) und TBK1 (TANK-binding kinase-1) verantwortlich sind für die direkte Aktivierung von IRF-3. Diese beiden Kinasen werden unter anderem durch dsRNA sowie durch eine virale Infektion aktiviert [Fitzgerald 2003]. Jedoch zeigte Takauji, dass die durch CpG-A induzierte Typ I IFN-Produktion unabhängig von der Phosphorylierung von IRF-3 ist [Takauji 2002]. Somit wäre IRF-7 ein potenzieller Kandidat, der den Unterschied zwischen beiden Klassen bedingen könnte.

Verleiht man CpG-B durch die Bindung an Nanopartikel eine partikuläre Struktur, so induziert es äquivalent hohe Mengen an IFN- $\alpha$  wie CpG-A. Fraglich ist jedoch, ob dieses partikuläre CpG-B auf Signaltransduktionsebene identisch ist mit CpG-A. Liefert der Partikelcharakter von CpG-ODN das notwendige Signal für die Aktivierung des Typ I IFN-Rezeptors, oder sind weitere CpG-A spezifische Signale wie Palindrom und G-Tetrade dazu notwendig? Eine mögliche Erklärung für die Amplifizierung der IFN- $\alpha$ -Produktion ist das Clustering von Rezeptoren. Ist dieser Vorgang notwendig, um den Typ I IFN-Rezeptor zu aktivieren?

Die Untersuchung der Signaltransduktion beider CpG-ODN-Klassen ist Gegenstand aktueller Forschung und sollte Aufschluss über die genauen Unterschiede geben.

### Bedeutung des BDCA-2-Moleküls:

Die Verfügbarkeit der beiden Modellstimuli CpG-A und CpG-B ermöglicht die Untersuchung der Wirkung weiterer Moleküle, die Einfluss auf die Typ I IFN-Synthese haben. BDCA-2 ist ein C-Typ-Lektin, das nur auf PDCs exprimiert wird [Dzionic 2000]. Die Funktion dieses neu entdeckten Moleküls ist noch weitestgehend ungeklärt. BDCA-2 scheint eine wichtige Rolle in der Antigen-Aufnahme zu spielen, da es internalisiert wird und T-Zellen präsentiert werden kann. Außerdem kommt dem BDCA-2-Molekül

eine wichtige Funktion in der Typ I IFN-Synthese zu. Dzionek zeigte, dass die Aktivierung von BDCA-2 zu einer spezifischen Inhibition der Typ I IFN-Synthese in PDCs führte. Als Stimuli für die IFN- $\alpha$ -Produktion dienten Influenza-Virus, Streptokokken, CpG-A oder Serum von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses [Dzionek 2001; Dzionek 2002]. Durch die Aktivierung von BDCA-2 kann demnach die IFN- $\alpha$ -Produktion inhibiert werden, die durch die verschiedensten Stimuli hervorgerufen wird. Die vorliegenden Daten zeigen, dass sowohl die CpG-A- als auch die CpG-B-vermittelte IFN- $\alpha$ -Synthese durch den aktivierenden BDCA-2-Antikörper gehemmt wird. CpG-B induziert IFN- $\alpha$  unabhängig vom Typ I IFN-Rezeptor. BDCA-2 kann daher nur mit der Typ I IFN-Synthese interferieren, die unabhängig vom Typ I IFN-Rezeptor ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Aktivierung von BDCA-2 auch die CpG-ODN-vermittelte TNF- $\alpha$ - und IFN- $\beta$ -Produktion spezifisch gehemmt wird.

### 4.4 Klinische Relevanz

#### Unterschiede zwischen CpG-A und CpG-B

CpG-Oligonukleotide stellen einen neuen vielversprechenden Therapieansatz dar, als Vakzineadjuvans, als Antiallergikum sowie in der antitumoralen Therapie (siehe Kapitel 1.4.4). Ihre Wirkung wird derzeit in mehreren tierexperimentellen und klinischen Studien erprobt. Durch die Differenzierung und Entwicklung verschiedener Klassen von CpG-ODN mit unterschiedlichem Wirkprofil, eröffnen sich neue Indikationsbereiche und Einsatzmöglichkeiten. Die *in vitro* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit stellen den ersten Schritt zur klinischen Entwicklung dieser neuen CpG-ODN-Klassen dar.

#### Verbesserung der CpG-ODN-vermittelten Wirkung durch Nanopartikel

Ein erheblicher Nachteil von therapeutischen Nukleinsäuren ist deren Instabilität und die daraus folgende niedrige Bioverfügbarkeit. Das einzige weltweit zugelassene therapeutische Oligonukleotid ist Formivirsen (Vitravene<sup>®</sup>), das zur Therapie der CMV-Retinitis (CMV=Zytomegalievirus) bei AIDS-Patienten eingesetzt wird. Dieses Oligonukleotid wird lokal in den Glaskörper injiziert. Um die Stabilität von Oligonukleotiden zur systemischen Anwendung zu erhöhen, steht eine Vielzahl von galenischen Hilfsmitteln zur Verfügung. Eine Möglichkeit stellt die Bindung von Oligonukleotiden an partikuläre Trägersysteme, wie z.B. Nanopartikel, Liposomen oder Mikropartikel, dar. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Oligonukleotiden an diese Trägersysteme deren Wirkung steigern kann [Lambert 2001a]. Die Wirkungssteigerung ist einerseits auf eine erhöhte Stabilität und Bioverfügbarkeit des Oligonukleotides zurückzuführen, andererseits auf einen gezielten Wirkstofftransport (siehe Kapitel 1.5.1, *Drug targeting*).

Die partikulären Trägersysteme gehören zu den modernen Arzneiformen und ermöglichen es Wirkstoffe so zu „verpacken“, dass ihr Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil optimiert wird (siehe Kapitel 1.5). Die stetige Zunahme an zugelassenen Medikamenten, die partikuläre Wirkstoffträgersysteme enthalten verdeutlicht deren wachsende Bedeutung. Beispiele für liposomale Formulierungen sind die Medikamente Caelyx<sup>®</sup> (Wirkstoff Doxorubicin) und Ambisome<sup>®</sup> (Wirkstoff Amphotericin B). In beiden Fäl-

len konnten die dosislimitierenden Nebenwirkungen (Kardiotoxizität bei Doxorubicin und Nephrotoxizität bei Amphotericin B) durch die liposomale Formulierung erheblich verringert werden. Ein Beispiel für ein Medikament auf Mikropartikelbasis ist das Präparat Enantone<sup>®</sup> (Wirkstoff Gonadorelin-Analogon). Hier wird durch die Einkapselung in Poly(glycolsäure-co-milchsäure)-Mikrokapseln eine Retardierung des Wirkstoffes erreicht. Medikamente auf Nanopartikelbasis sind derzeit noch nicht auf dem Markt verfügbar.

Neuesten Erkenntnissen zufolge, kommt der Verwendung von partikulären Trägersystemen insbesondere bei der Herstellung von Impfstoffen eine große Bedeutung zu. Durch die Koadministration von Vakzineadjuvans und Antigen kann eine gesteigerte Immunantwort erreicht werden. Die partikulären Trägersysteme bieten die Möglichkeit, durch Bindung von Adjuvans und Antigen an einen Partikel, diese beiden Agenzien in räumliche Nähe zu bringen. So konnte durch dieses Vorgehen die Immunantwort nach der Impfung, im Vergleich zu der separaten Administration von Vakzineadjuvans und Antigen, erheblich gesteigert werden [Gursel 2001; Diwan 2002]. Nanopartikel als Trägersysteme für CpG-ODN können somit genutzt werden, um die Wirkung von CpG-ODN als Vakzineadjuvans zu optimieren, insbesondere durch die Möglichkeit, verschiedene Antigene und weitere Adjuvanzen an den Nanopartikel binden zu können. Die präsentierten Daten bilden eine erste Grundlage zur Entwicklung eines solchen Systems.

### Regulation der Typ I IFN-Produktion

Einigen Autoimmunerkrankungen liegt eine Störung der Typ I IFN-Produktion zugrunde. Bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) wurden erhöhte Konzentrationen von Typ I IFN im Blut gemessen [Ronnblohm 2001]. Die gezielte Hemmung der Typ I IFN-Synthese durch den Einsatz von Antikörpern, wie den hier untersuchten Typ I IFN-Rezeptor und BDCA-2-Rezeptor Antikörpern, stellt einen möglichen Therapieansatz dar. In der Tat konnte durch die Aktivierung von BDCA-2 die IFN- $\alpha$ -Produktion in PDCs gehemmt werden, die durch das Serum von SLE-Patienten hervorgerufen wurde [Dzionic 2001].

Neben der Hemmung der Typ I IFN-Produktion bei Autoimmunerkrankungen stellt auch die Induktion von Typ I IFN einen wichtigen Therapieansatz dar. Rekombinant

hergestelltes IFN- $\alpha$ -2a und IFN- $\alpha$ -2b wird erfolgreich bei chronischer Hepatitis B und C sowie bei einer Vielzahl von malignen Erkrankungen eingesetzt (siehe Kapitel 1.3.3). Durch die Entwicklung eines Induktors der körpereigenen Typ I IFN-Synthese, wie z.B. CpG-A, könnte somit ein gleichwertiges Therapeutikum geschaffen werden. Der Vorteil des Einsatzes von Typ I IFN-Induktoren stellt die Induktion eines breiteren Spektrums an Typ I IFN-Isotypen dar.

### Funktion und Bedeutung der plasmazytoiden dendritischen Zelle

Als Hauptproduzent von Typ I IFN im menschlichen Körper kommt der PDC eine wichtige Bedeutung in der soeben beschriebenen Regulation der Typ I IFN-Produktion zu. Wie bereits eingehend in der Einleitung (siehe Kapitel 1.2) diskutiert, spielt die PDC eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von HIV-Infektionen, Autoimmunerkrankungen und Tumor-Erkrankungen. Die Erforschung der PDC erweitert somit das Verständnis der Pathogenese und ermöglicht die Entwicklung neuer Therapieansätze.

Die Reduktion der Anzahl von PDCs und der Verlust ihrer Fähigkeit, IFN- $\alpha$  zu produzieren, geht bei einer HIV-Infektion einher mit einer erhöhten Viruslast und einer Zunahme an opportunistischen Infektionen [Donaghy 2001; Soumelis 2001]. Ein denkbarer Therapieansatz wäre hier der Transfer von allogenen *ex vivo* stimulierten PDCs oder die Verabreichung von PDC-stimulierenden Agenzien, wie den hier vorgestellten CpG-Oligonukleotiden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

### Einleitung

CpG-Oligonukleotide stellen das synthetische Pendant der bakteriellen DNA dar. Aufgrund ihrer immunstimulierenden Wirkung wird derzeit in ersten klinischen Studien ihr Einsatz als Vakzineadjuvans, als Antiallergikum und als antitumoraler Wirkstoff untersucht. Seit kurzem unterscheidet man zwei Klassen von CpG-Oligonukleotiden. Die Klasse A (CpG-A) zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, sehr hohe Mengen des antiviralen Zytokins IFN- $\alpha$  (IFN = Interferon) zu induzieren, wohingegen die Klasse B (CpG-B) hauptsächlich durch ihre B-Zell-stimulierenden Eigenschaften charakterisiert ist. Der plasmazytoide dendritische Zelle kommt in der Erkennung von CpG-Oligonukleotiden eine besondere Bedeutung zu, da sie neben der B-Zelle die einzige Zelle des menschlichen Immunsystems ist, die den *Toll-like-Rezeptor-9* exprimiert und daher CpG-Oligonukleotide erkennt. Als Typ I IFN-produzierende Zelle des menschlichen Körpers spielt die plasmazytoide dendritische Zelle eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und viralen Infektionen.

### Fragestellung

Gegenstand der vorliegenden Dissertation war es, zu untersuchen, inwiefern sich diese beiden Klassen von CpG-Oligonukleotiden bezüglich ihrer Struktur und ihrer Wirkung auf plasmazytoide dendritische Zellen unterscheiden. Daraus ergab sich die zentrale Frage, ob ein Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung besteht.

### Material und Methoden

Mittels Gelelektrophorese und Rasterkraftmikroskopie wurde untersucht, inwiefern sich die beiden Klassen von CpG-Oligonukleotiden in ihrer Fähigkeit unterscheiden, inter- und intramolekulare Bindungen einzugehen und höhermolekulare Komplexe zu bilden. Um die Wirkung der beiden Typen von CpG-Oligonukleotiden auf plasmazytoide dendritische Zellen zu untersuchen wurde die Zytokinproduktion sowie die Aktivierung der plasmazytoiden dendritischen Zelle nach Kultur mit CpG-Oligonukleotiden bestimmt. Außerdem wurde der Einfluss zweier Antikörper, die spezifisch in die Typ I IFN-Synthese eingreifen, auf die CpG-vermittelte Zytokinproduktion analysiert. Um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung besteht, wurde die



Struktur der Oligonukleotide durch Bindung an Nanopartikel oder durch Veränderung der Sequenz modifiziert. Anschließend wurde die immunstimulierende Wirkung untersucht.

### Ergebnisse

Im Gegensatz zu CpG-B besitzt CpG-A die Fähigkeit partikelartige höhermolekulare Komplexe zu bilden, die mit dem Rasterkraftmikroskop sichtbar gemacht werden können. Die Komplexbildung von CpG-A findet unter physiologischen Bedingungen statt und ist auf die Koexistenz von Palindrom und Poly-G-Motiven zurückzuführen. Kontroll-Oligonukleotide, denen eines dieser beiden Strukturmerkmale fehlt zeigen eine reduzierte Komplexbildung sowie eine verminderte Fähigkeit, IFN- $\alpha$  zu induzieren. Verleiht man CpG-B durch die Bindung an Nanopartikel ebenfalls eine partikuläre Struktur, so induziert es äquivalent hohe Mengen an IFN- $\alpha$  wie CpG-A. Diese extreme Steigerung der IFN- $\alpha$ -Synthese korreliert weder mit einer erhöhten Aufnahme in die Zelle, noch mit der Steigerung der Synthese anderer Zytokine. Diese Daten lassen die Hypothese zu, dass für den Parameter IFN- $\alpha$  eine Struktur-Wirkungs-Beziehung besteht.

Die beiden Klassen von CpG-Oligonukleotiden aktivieren unterschiedliche Signaltransduktionswege in der plasmazytoiden dendritischen Zelle. Die durch CpG-A-vermittelte IFN- $\alpha$ -, IFN- $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Produktion wird über den Typ I IFN-Rezeptor amplifiziert. Im Gegensatz dazu ist die durch CpG-B-induzierte Zytokinproduktion unabhängig von diesem Rückkopplungsmechanismus. BDCA-2 beeinflusst selektiv die Typ I IFN-Synthese, die unabhängig vom Typ I IFN-Rezeptor ist und von beiden CpG-Oligonukleotid-Klassen aktiviert wird.

### Diskussion

Die Strukturanalyse der Oligonukleotide trägt zu einem besseren Verständnis der Komplexbildung von Nucleinsäuren bei. Durch den Vergleich mit Kontroll-Oligonukleotiden gelang es, die Bedeutung der Koexistenz von Palindrom und Poly-G-Motiv in der Komplexgenese von CpG-A darzustellen. Demnach scheint das Palindrom die Bildung von G-Tetraden-basierten Nucleinsäure Komplexen zu fördern und deren Stabilität zu erhöhen. Die Stabilität dieser Komplexe unter physiologischen Bedingungen lässt vermuten, dass ein Strukturerhalt *in vivo* besteht.

Die Differenzierung von CpG-Oligonukleotid-Klassen und die Definition unterschiedlicher Wirkprofile erweitert den Anwendungsbereich dieser immunstimulatorischen Oligonukleotide. Zum ersten Mal wurde mit einer bildgebenden Methodik bewiesen, dass sich die beiden Klassen von CpG-Oligonukleotiden deutlich in ihrer Tertiärstruktur unterscheiden. Zusammen mit den Daten, die die unterschiedliche Wirkung von CpG-A und CpG-B auf PDCs belegen, verdeutlichen diese Ergebnisse, dass für die beiden CpG-Oligonukleotid-Klassen eine Struktur-Wirkungsbeziehung besteht. Diese Befunde stellen einen wichtigen Schritt in der Definition der beiden CpG-Oligonukleotid-Klassen dar und ebnen somit den Weg für die weitere therapeutische Entwicklung dieser Wirkstoffgruppe.

Die pathophysiologische Bedeutung der plasmazytoiden dendritischen Zelle wird derzeit intensiv erforscht. Neuesten Erkenntnissen zufolge spielt dieser Zelltyp eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, viralen Infektionen und Tumor-Erkrankungen, ebenso das hauptsächlich von plasmazytoiden dendritischen Zellen gebildete Typ I IFN. Die vorliegenden *in vitro* Daten erweitern die Kenntnisse über die Funktion der plasmazytoiden dendritischen Zelle und die Regulation der Typ I IFN-Synthese in diesem Zelltyp. Zum ersten Mal wurde die Existenz von zwei unterschiedlichen Signalwegen der Typ I IFN-Induktion in plasmazytoiden dendritischen Zellen nachgewiesen. CpG-A und CpG-B können somit als Modellstimuli dienen, um diese beiden Wege der Typ I IFN-Synthese zu aktivieren und um die Bedeutung weiterer Moleküle, wie BDCA-2, die Einfluss auf die Typ I IFN-Synthese haben, zu definieren.

Die Präsentation von CpG-Motiven in partikulärer Form führt zu einer spezifischen Steigerung der IFN- $\alpha$ -Synthese in plasmazytoiden dendritischen Zellen. Die Bindung von CpG-Oligonukleotiden an Nanopartikel oder der Einsatz von CpG-Oligonukleotiden, wie CpG-A, die die Fähigkeit besitzen unter physiologischen Bedingungen Nukleinsäure-basierte Partikel zu bilden, eröffnen die Möglichkeit der gezielten endogenen Induktion der IFN- $\alpha$ -Synthese, die auch therapeutisch genutzt werden kann.

Durch die Anwendung von partikulären Wirkstoffträgern kann die Stabilität eines Wirkstoffes erhöht und seine Effektivität sowie sein Nebenwirkungspotential optimiert werden. Die Ergebnisse beleuchten neben den bekannten Vorteilen der partikulären Wirkstoffträgersysteme einen völlig neuen Aspekt: durch die Präsentation des Wirkstoff-

fes in Partikelform können einige Effekte, wie z.B. die IFN- $\alpha$ -Induktion, selektiv amplifiziert werden. Der Vergleich zweier Nanopartikelarten verdeutlicht jedoch, dass qualitative Unterschiede zwischen den verschiedenen Partikelsystemen bestehen. Die Ergebnisse bilden eine erste Grundlage für die Entwicklung einer Nanopartikel-basierten CpG-Formulierung.

### Schlussfolgerung

Die vorliegende Dissertation erörtert Fragestellungen, die der Immunologie, der pharmazeutischen Technologie und der Biochemie zuzuordnen sind. Sie liefert wichtige neue Erkenntnisse, die die Definition verschiedener CpG-Oligonukleotid-Klassen, die Regulation der Typ I IFN-Synthese in plasmazytoiden dendritischen Zellen, die Komplexbildung von Nukleinsäuren sowie die Anwendung von Nanopartikeln als Trägersystem für CpG-Oligonukleotide betreffen. Die klinische Relevanz ist einerseits durch die pathophysiologische Bedeutung der plasmazytoiden dendritischen Zelle und der Typ I Interferone begründet und andererseits durch die therapeutische Anwendung der immunstimulatorischen CpG-Oligonukleotide.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abb, J., H. Abb, et al. (1983). "Phenotype of human alpha-interferon producing leucocytes identified by monoclonal antibodies." Clin Exp Immunol **52**: 179-84.
- Akira, S., K. Takeda, et al. (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." Nat Immunol **2**(8): 675-80.
- Alberti, P. and J. L. Mergny (2003). "DNA duplex-quadruplex exchange as the basis for a nanomolecular machine." PNAS **100**(4): 1569-1573.
- Aynie, I., C. Vauthier, et al. (1999). "Spongelike alginate nanoparticles as a new potential system for the delivery of antisense oligonucleotides." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **9**(3): 301-12.
- Barchet, W., M. Cella, et al. (2002). "Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo." J Exp Med **195**(4): 507-16.
- Basu, S. and E. Wickstrom (1997). "Temperature and salt dependence of higher order structure formation by antisense c-myc and c-myb phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides containing tetraguanylate tracts." Nucleic Acids Res **25**(7): 1327-32.
- Bauer, M., K. Heeg, et al. (1999). "DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner." Immunology **97**: 699-705.
- Bauer, M., V. Redecke, et al. (2001a). "Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells." J Immunol **166**: 5000-7.
- Bauer, S., C. J. Kirschning, et al. (2001b). "Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9237-42.
- Beltinger, C., H. U. Saragovi, et al. (1995). "Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides." J Clin Invest **95**(4): 1814-23.
- Benimetskaya, L., M. Berton, et al. (1997). "Formation of a G-tetrad and higher order structures correlates with biological activity of the RelA (NF-kappaB p65) 'antisense' oligodeoxynucleotide." Nucleic Acids Res **25**(13): 2648-56.
- Bernasconi, N. L., N. Onai, et al. (2003). "A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells." Blood **101**(11): 4500-4.
- Binnig, G., C. F. Quate, et al. (1986). "Atomic force microscope." Physical Review Letters **56**(9): 930-933.
- Biron, C. A. (2001). "Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look." Immunity **14**(6): 661-4.
- Biron, C. A., K. B. Nguyen, et al. (1999). "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." Annu Rev Immunol **17**: 189-220.
- Birrenbach, G. and P. P. Speiser (1976). "Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology." J Pharm Sci **65**(12): 1763-6.
- Blackburn, E. H. (1994). "Telomeres: no end in sight." Cell **77**(5): 621-3.
- Blomberg, S., M. L. Eloranta, et al. (2001). "Presence of cutaneous interferon-alpha producing cells in patients with systemic lupus erythematosus." Lupus **10**(7): 484-90.
- Blunk, T., D. F. Hochstrasser, et al. (1993). "Colloidal carriers for intravenous drug targeting: plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles

- evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis." Electrophoresis **14**(12): 1382-7.
- Bogdan, C. (2000). "The function of type I interferons in antimicrobial immunity." Curr Opin Immunol **12**(4): 419-24.
- Brigger, I., C. Dubernet, et al. (2002). "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis." Adv Drug Deliv Rev **54**(5): 631-51.
- Brunner, C., J. Seiderer, et al. (2000). "Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate- guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti- tumor immune responses in vivo." J Immunol **165**(11): 6278-86.
- Cederblad, B., S. Blomberg, et al. (1998). "Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of circulating natural interferon-alpha- producing cells." J Autoimmun **11**(5): 465-70.
- Cella, M., F. Facchetti, et al. (2000). "Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization." Nat Immunol **1**(4): 305-310.
- Cella, M., D. Jarrossay, et al. (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**: 919-23.
- Chiannikulchai, N., Z. Driouich, et al. (1989). "Doxorubicin-loaded nanoparticles: increased efficiency in murine hepatic metastases." Sel Cancer Ther **5**(1): 1-11.
- Coley, W. B. (1893). "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases." Am J Med Sci **105**: 487-511.
- Comeau, M. R., A. R. Van der Vuurst de Vries, et al. (2002). "CD123bright plasmacytoid predendritic cells: progenitors undergoing cell fate conversion?" J Immunol **169**(1): 75-83.
- Dalpke, A. H., S. Zimmermann, et al. (2002). "Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo." Immunology **106**(1): 102-12.
- Davis, H. L., I. Suparto, et al. (2000). "CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans." Vaccine **18**(18): 1920-4.
- Delain, E., A. Fourcade, et al. (1992). "Comparative observations of biological specimens, especially DNA and filamentous actin molecules in atomic force, tunneling and electron microscopes." Microscopy Microanalysis Microstructures **3**: 457-470.
- Deng, G. M., I. M. Nilsson, et al. (1999). "Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis." Nat Med **5**(6): 702-5.
- Diwan, M., M. Tafaghodi, et al. (2002). "Enhancement of immune responses by co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres." J Control Release **85**(1-3): 247-62.
- Donaghy, H., A. Pozniak, et al. (2001). "Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load." Blood **98**(8): 2574-6.
- Dzionek, A., A. Fuchs, et al. (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." J Immunol **165**(11): 6037-46.
- Dzionek, A., Y. Inagaki, et al. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions(1)." Hum Immunol **63**(12): 1133-48.

- Dzionic, A., Y. Sohma, et al. (2001). "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction." *J Exp Med* **194**(12): 1823-34.
- Facchetti, F., G. Boden, et al. (1990). "Plasmacytoid monocytes in Jessner's lymphocytic infiltration of the skin." *Am J Dermatopathol* **12**(4): 363-9.
- Facchetti, F., C. de Wolf-Peeters, et al. (1988). "Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin." *Am J Pathol* **133**(1): 15-21.
- Fearon, K., J. D. Marshall, et al. (2003). "A minimal human immunostimulatory CpG motif that potently induces IFN-gamma and IFN-alpha production." *Eur J Immunol* **33**(8): 2114-22.
- Ferbas, J. J., J. F. Toso, et al. (1994). "CD4+ blood dendritic cells are potent producers of IFN-alpha in response to in vitro HIV-1 infection." *J Immunol* **152**(9): 4649-62.
- Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, et al. (2003). "IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway." *Nat Immunol* **4**(5): 491-6.
- Fonteneau, J. F., M. Gilliet, et al. (2003). "Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity." *Blood*.
- Fritz, H., M. Maier, et al. (1997). "Cationic Polystyrene Nanoparticles: Preparation and Characterization of a Model Drug Carrier System for Antisense Oligonucleotides." *J Colloid Interface Sci* **195**(2): 272-88.
- Gantner, F., P. Hermann, et al. (2003). "CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides." *Eur J Immunol* **33**(6): 1576-85.
- Gellert, M., M. N. Lipsett, et al. (1962). *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**: 2013-2018.
- Gilbert, D. E. and J. Feigon (1999). "Multistranded DNA structures." *Curr Opin Struct Biol* **9**(3): 305-14.
- Gilliet, M. and Y. J. Liu (2002). "Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells." *Hum Immunol* **63**(12): 1149-55.
- Gref, R., Y. Minamitake, et al. (1994). "Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres." *Science* **263**(5153): 1600-3.
- Grouard, G., M. C. Rissoan, et al. (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." *J Exp Med* **185**: 1101-11.
- Gursel, I., M. Gursel, et al. (2001). "Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides." *J Immunol* **167**(6): 3324-8.
- Gursel, M., D. Verthelyi, et al. (2002). "Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide." *J Leukoc Biol* **71**(5): 813-20.
- Hafner, M., R. Zawatzky, et al. (2001). "Antimetastatic effect of CpG DNA mediated by type I IFN." *Cancer Res* **61**(14): 5523-8.
- Halperin, S. A., G. Van Nest, et al. (2003). "A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant." *Vaccine* **21**(19-20): 2461-7.
- Hansma, H. G., I. Revenko, et al. (1996). "Atomic force microscopy of long and short double-stranded, single-stranded and triple-stranded nucleic acids." *Nucleic Acids Res* **24**(4): 713-20.

- Hartmann, G., J. Battiany, et al. (2003). "Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **33**(6): 1633-41.
- Hartmann, G. and A. M. Krieg (2000a). "Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells." J Immunol **164**(2): 944-53.
- Hartmann, G., A. Krug, et al. (1998). "Spontaneous and cationic lipid-mediated uptake of antisense oligonucleotides in human monocytes and lymphocytes." J Pharmacol Exp Ther **285**: 920-8.
- Hartmann, G., R. D. Weeratna, et al. (2000b). "Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo." J Immunol **164**(3): 1617-24.
- Heckelsmiller, K., S. Beck, et al. (2002a). "Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy." Eur J Immunol **32**(11): 3235-45.
- Heckelsmiller, K., K. Rall, et al. (2002b). "Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model." J Immunol **169**(7): 3892-9.
- Hemmi, H., T. Kaisho, et al. (2003). "The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets." J Immunol **170**(6): 3059-64.
- Hemmi, H., T. Kaisho, et al. (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88- dependent signaling pathway." Nat Immunol **3**(2): 196-200.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, et al. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**: 740-745.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, et al. (2002). "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides." J Immunol **168**(9): 4531-7.
- Ioannou, Y. and D. A. Isenberg (2000). "Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy." Arthritis Rheum **43**(7): 1431-42.
- Ito, T., R. Amakawa, et al. (2001). "Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs." J Immunol **166**(5): 2961-9.
- Ito, T., R. Amakawa, et al. (2002). "Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll- like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets." J Exp Med **195**(11): 1507-12.
- Jahnsen, F. L., F. Lund-Johansen, et al. (2000). "Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy." J Immunol **165**(7): 4062-8.
- Jani, P., G. W. Halbert, et al. (1989). "The uptake and translocation of latex nanospheres and microspheres after oral administration to rats." J Pharm Pharmacol **41**(12): 809-12.
- Jing, N. (2000a). "Developing G-quartet oligonucleotides as novel anti-HIV agents: focus on anti-HIV drug design." Expert Opin Investig Drugs **9**(8): 1777-85.
- Jing, N., E. De Clercq, et al. (2000b). "Stability-activity relationships of a family of G-tetrad forming oligonucleotides as potent HIV inhibitors. A basis for anti-HIV drug design." J Biol Chem **275**(5): 3421-30.
- Jing, N., C. Marchand, et al. (2001). "Structure-activity of inhibition of HIV-1 integrase and virus replication by G-quartet oligonucleotides." DNA Cell Biol **20**(8): 499-508.

- Jing, N., R. F. Rando, et al. (1997). "Ion selective folding of loop domains in a potent anti-HIV oligonucleotide." Biochemistry **36**(41): 12498-505.
- Jing, N., W. Xiong, et al. (2002). "Potassium-dependent folding: a key to intracellular delivery of G-quartet oligonucleotides as HIV inhibitors." Biochemistry **41**(17): 5397-403.
- Jones, T. R., N. Obaldia, 3rd, et al. (1999). "Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys." Vaccine **17**(23-24): 3065-71.
- Juliano, R. L., S. Alahari, et al. (1999). "Antisense pharmacodynamics: critical issues in the transport and delivery of antisense oligonucleotides." Pharm Res **16**(4): 494-502.
- Junghans, M., J. Kreuter, et al. (2000). "Antisense delivery using protamine-oligonucleotide particles." Nucleic Acids Res **28**(10): E45.
- Kadowaki, N., S. Antonenko, et al. (2000). "Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity." J Exp Med **192**(2): 219-26.
- Kadowaki, N., S. Antonenko, et al. (2001a). "Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN." J Immunol **166**(4): 2291-5.
- Kadowaki, N., S. Ho, et al. (2001b). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens." J Exp Med **194**(6): 863-9.
- Kadowaki, N. and Y. J. Liu (2002). "Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity." Hum Immunol **63**(12): 1126-32.
- Kang, C., X. Zhang, et al. (1992). "Crystal structure of four-stranded Oxytricha telomeric DNA." Nature **356**(6365): 126-31.
- Karlin, S., W. Doerfler, et al. (1994). "Why is CpG suppressed in the genomes of virtually all small eukaryotic viruses but not in those of large eukaryotic viruses?" J Virol **68**: 2889-2897.
- Kattan, J., J. P. Droz, et al. (1992). "Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of doxorubicin carried by polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles." Invest New Drugs **10**(3): 191-9.
- Katze, M. G., Y. He, et al. (2002). "Viruses and interferon: a fight for supremacy." Nat Rev Immunol **2**(9): 675-87.
- Kawarada, Y., R. Ganss, et al. (2001). "NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides." J Immunol **167**(9): 5247-53.
- Keniry, M. A. (2000). "Quadruplex structures in nucleic acids." Biopolymers **56**(3): 123-46.
- Kerkmann, M., S. Rothenfusser, et al. (2003). "Activation with CpG-A and CpG-B Oligonucleotides Reveals Two Distinct Regulatory Pathways of Type I IFN Synthesis in Human Plasmacytoid Dendritic Cells." J Immunol **170**(9): 4465-74.
- Kimura, Y., K. Sonehara, et al. (1994). "Binding of oligoguanylate to scavenger receptors is required for oligonucleotides to augment NK cell activity and induce IFN." J Biochem (Tokyo) **116**(5): 991-4.
- Kline, J. N., T. J. Waldschmidt, et al. (1998). "Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma." J Immunol **160**(6): 2555-9.
- Krieg, A. M. (2002). "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." Annu Rev Immunol **20**: 709-60.



- Krieg, A. M., L. Love-Homan, et al. (1998). "CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge." J Immunol **161**(5): 2428-34.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, et al. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." Nature **374**(6522): 546-9.
- Krug, A., S. Rothenfusser, et al. (2001a). "Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- $\alpha/\beta$  in plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **31**: 2154-63.
- Krug, A., S. Rothenfusser, et al. (2003a). "CpG-A oligonucleotides induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells." J Immunol **170**(7): 3468-77.
- Krug, A., A. Towarowski, et al. (2001b). "Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12." Eur J Immunol **31**(10): 3026-37.
- Krug, A., R. Veeraswamy, et al. (2003b). "Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells." J Exp Med **197**(7): 899-906.
- Lambert, G., E. Fattal, et al. (2001a). "Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides." Adv Drug Deliv Rev **47**(1): 99-112.
- Lambert, G., E. Fattal, et al. (2001b). "Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core for the delivery of oligonucleotides." Int J Pharm **214**(1-2): 13-6.
- Laughlan, G., A. I. Murchie, et al. (1994). "The high-resolution crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex." Science **265**(5171): 520-4.
- Le Bon, A., G. Schiavoni, et al. (2001). "Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo." Immunity **14**(4): 461-70.
- Lee, S. W., M. K. Song, et al. (2000). "Effects of a hexameric deoxyriboguanosine run conjugation into CpG oligodeoxynucleotides on their immunostimulatory potentials." J Immunol **165**(7): 3631-9.
- Lenaerts, V., J. F. Nagelkerke, et al. (1984). "In vivo uptake of polyisobutyl cyanoacrylate nanoparticles by rat liver Kupffer, endothelial, and parenchymal cells." J Pharm Sci **73**(7): 980-2.
- Lennert, K., E. Kaiserling, et al. (1975). "Letter: T-associated plasma-cells." Lancet **1**(7914): 1031-2.
- Lennert, K. and W. Remmele (1958). "Karyometrische Untersuchungen an Lymphknotenzellen des Menschen I. Mitteilung: Germinoblasten, Lymphoblasten und Lymphozyten." Acta Haemat **19**: 99.
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998). Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Ly, H., D. P. Nierlich, et al. (1999). "Moloney murine sarcoma virus genomic RNAs dimerize via a two-step process: a concentration-dependent kissing-loop interaction is driven by initial contact between consecutive guanines." J Virol **73**(9): 7255-61.
- Macfarlane, D. E., L. Manzel, et al. (1997). "Unmethylated CpG-containing oligodeoxynucleotides inhibit apoptosis in WEHI 231 B lymphocytes induced by several agents: evidence for blockade of apoptosis at a distal signalling step." Immunology **91**(4): 586-93.
- Magnusson, M., E. Johansson, et al. (2001a). "The plasmid pcDNA3 differentially induces production of interferon-alpha and interleukin-6 in cultures of porcine leukocytes." Vet Immunol Immunopathol **78**(1): 45-56.

- Magnusson, M., S. Magnusson, et al. (2001b). "Importance of CpG dinucleotides in activation of natural IFN- $\alpha$ -producing cells by a lupus-related oligodeoxynucleotide." Scand J Immunol **54**(6): 543-50.
- Marie, I., J. E. Durbin, et al. (1998). "Differential viral induction of distinct interferon- $\alpha$  genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7." Embo J **17**(22): 6660-9.
- Marrack, P., J. Kappler, et al. (1999). "Type I interferons keep activated T cells alive." J Exp Med **189**(3): 521-30.
- Marsh, T. C. and E. Henderson (1994). "G-wires: self-assembly of a telomeric oligonucleotide, d(GGGGTTGGGG), into large superstructures." Biochemistry **33**(35): 10718-24.
- Marsh, T. C., J. Vesenska, et al. (1995). "A new DNA nanostructure, the G-wire, imaged by scanning probe microscopy." Nucleic Acids Res **23**(4): 696-700.
- Marshall, J. D., K. Fearon, et al. (2003). "Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions." J Leukoc Biol **73**(6): 781-92.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." Curr Opin Immunol **9**(1): 4-9.
- Menei, P., A. Croue, et al. (1994). "Fate and biocompatibility of three types of microspheres implanted into the brain." J Biomed Mater Res **28**(9): 1079-85.
- Mergny, J. L., L. Lacroix, et al. (2001). "Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3062-7.
- Moghimi, S. M., A. C. Hunter, et al. (2001). "Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice." Pharmacol Rev **53**(2): 283-318.
- Monks, C. R., B. A. Freiberg, et al. (1998). "Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells." Nature **395**(6697): 82-6.
- Mui, B., S. G. Raney, et al. (2001). "Immune stimulation by a CpG-containing oligodeoxynucleotide is enhanced when encapsulated and delivered in lipid particles." J Pharmacol Exp Ther **298**(3): 1185-92.
- Muller-Hermelink, H. K., E. Kaiserling, et al. (1973). "[Pseudofollicular nests of plasmacells of a special type in paracortical pulp of human lymph nodes]." Virchows Arch B Cell Pathol **14**(1): 47-56.
- Mutschler, E., G. Geisslinger, et al. (2001). Arzneimittelwirkungen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001.
- Nauts, H. C. (1980). "The beneficial effects of bacterial infections on host resistance to cancer: end results in 449 cases." (Cancer Research Institute monograph no. 8, 2nd ed.).
- O'Doherty, U., M. Peng, et al. (1994). "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature." Immunology **82**(3): 487-93.
- Ortaldo, J. R., A. Mantovani, et al. (1983). "Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes." Int J Cancer **31**(3): 285-9.
- Parronchi, P., F. Brugnolo, et al. (1999). "Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4<sup>+</sup> T cells into Th1 effectors." J Immunol **163**(11): 5946-53.
- Pashenkov, M., Y. M. Huang, et al. (2001). "Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid." Brain **124**(Pt 3): 480-92.

- Patterson, S., A. Rae, et al. (2001). "Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus." J Virol **75**(14): 6710-3.
- Patterson, S., S. P. Robinson, et al. (1999). "Subpopulations of peripheral blood dendritic cells show differential susceptibility to infection with a lymphotropic strain of HIV-1." Immunol Lett **66**(1-3): 111-6.
- Penna, G., S. Sozzani, et al. (2001). "Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **167**(4): 1862-6.
- Peter, H. H., H. Dallugge, et al. (1980). "Human peripheral null lymphocytes. II. Producers of type-1 interferon upon stimulation with tumor cells, Herpes simplex virus and *Corynebacterium parvum*." Eur J Immunol **10**(7): 547-55.
- Phan, A. T. and J. L. Mergny (2002). "Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix." Nucleic Acids Res **30**(21): 4618-25.
- Pralle, A., P. Keller, et al. (2000). "Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells." J Cell Biol **148**(5): 997-1008.
- Remoli, M. E., E. Giacomini, et al. (2002). "Selective expression of type I IFN genes in human dendritic cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*." J Immunol **169**(1): 366-74.
- Rissoan, M. C., V. Soumelis, et al. (1999). "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." Science **283**(5405): 1183-6.
- Romagnoli, P. and C. Bron (1997). "Phosphatidylinositol-based glycolipid-anchored proteins enhance proximal TCR signaling events." J Immunol **158**(12): 5757-64.
- Ronnblom, L. and G. V. Alm (2001). "A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus." J Exp Med **194**(12): F59-63.
- Ronnblom, L. E., G. V. Alm, et al. (1991). "Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid tumors." Ann Intern Med **115**(3): 178-83.
- Rothenfusser, S., V. Hornung, et al. (2001). "Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta." Eur J Immunol **31**(12): 3525-34.
- Rothenfusser, S., E. Tuma, et al. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG(1)." Hum Immunol **63**(12): 1111-9.
- Sandberg, K., P. Matsson, et al. (1990). "A distinct population of nonphagocytic and low level CD4+ null lymphocytes produce IFN-alpha after stimulation by herpes simplex virus-infected cells." J Immunol **145**(3): 1015-20.
- Sato, M., N. Hata, et al. (1998). "Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7." FEBS Lett **441**(1): 106-10.
- Sen, D. and W. Gilbert (1988). "Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis." Nature **334**(6180): 364-6.
- Sen, D. and W. Gilbert (1990). "A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA." Nature **344**(6265): 410-4.
- Sethi, S., G. Lipford, et al. (2002). "Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity." Lancet **360**(9328): 229-30.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-7.
- Soumelis, V., I. Scott, et al. (2001). "Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients." Blood **98**(4): 906-12.
- Stella, B., S. Arpicco, et al. (2000). "Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting." J Pharm Sci **89**(11): 1452-64.

- Sundquist, W. I. and S. Heaphy (1993). "Evidence for interstrand quadruplex formation in the dimerization of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3393-7.
- Sur, S., J. S. Wild, et al. (1999). "Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides." J Immunol **162**(10): 6284-93.
- Takauji, R., S. Iho, et al. (2002). "CpG-DNA-induced IFN-alpha production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors." J Leukoc Biol **72**(5): 1011-9.
- Tokunaga, T., H. Yamamoto, et al. (1984). "Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity." J Natl Cancer Inst **72**: 955-62.
- Tondelli, L., A. Ricca, et al. (1998). "Highly efficient cellular uptake of c-myc antisense oligonucleotides through specifically designed polymeric nanospheres." Nucleic Acids Res **26**(23): 5425-31.
- Tschoep, K., G. Hartmann, et al. (2001). "Shock waves: a novel method for cytoplasmic delivery of antisense oligonucleotides." J Mol Med **79**(5-6): 306-13.
- Vallin, H., S. Blomberg, et al. (1999). "Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN-alpha) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells." Clin Exp Immunol **115**(1): 196-202.
- Van Uden, J. and E. Raz (1999). "Immunostimulatory DNA and applications to allergic disease." J Allergy Clin Immunol **104**(5): 902-10.
- Vereb, G., J. Matko, et al. (2000). "Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 6013-8.
- Wagner, H. (2002). "Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity." Curr Opin Microbiol **5**(1): 62-9.
- Weiden, M., N. Tanaka, et al. (2000). "Differentiation of monocytes to macrophages switches the Mycobacterium tuberculosis effect on HIV-1 replication from stimulation to inhibition: modulation of interferon response and CCAAT/enhancer binding protein beta expression." J Immunol **165**(4): 2028-39.
- Wilbrink, B., I. M. van der Heijden, et al. (1998). "Detection of bacterial DNA in joint samples from patients with undifferentiated arthritis and reactive arthritis, using polymerase chain reaction with universal 16S ribosomal RNA primers." Arthritis Rheum **41**(3): 535-43.
- Wollenberg, A., M. Wagner, et al. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases." J Invest Dermatol **119**(5): 1096-102.
- Wooldridge, J. E., Z. Ballas, et al. (1997). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma." Blood **89**(8): 2994-8.
- Xavier, R., T. Brennan, et al. (1998). "Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation." Immunity **8**(6): 723-32.
- Yakubov, L. A., E. A. Deeva, et al. (1989). "Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors?" Proc Natl Acad Sci U S A **86**(17): 6454-8.
- Yamamoto, S., T. Yamamoto, et al. (1992). "DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth." Microbiol Immunol **36**: 983-97.

- Yi, A. K. and A. M. Krieg (1998). "Rapid induction of mitogen-activated protein kinases by immune stimulatory CpG DNA." J Immunol **161**(9): 4493-7.
- Ytterberg, S. R. and T. J. Schnitzer (1982). "Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **25**(4): 401-6.
- Zeuner, R. A., K. J. Ishii, et al. (2002). "Reduction of CpG-induced arthritis by suppressive oligodeoxynucleotides." Arthritis Rheum **46**(8): 2219-24.
- Zhang, X., S. Sun, et al. (1998). "Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15." Immunity **8**(5): 591-9.
- Zhao, Q., T. Waldschmidt, et al. (1994). "Stage-specific oligonucleotide uptake in murine bone marrow B-cell precursors." Blood **84**(11): 3660-6.
- Zimmermann, S., O. Egeter, et al. (1998). "CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis." J Immunol **160**(8): 3627-30.
- Zobel, H. P., J. Kreuter, et al. (1997). "Cationic polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for antisense oligonucleotides." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **7**(5): 483-93.
- Zou, W., V. Machelon, et al. (2001). "Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells." Nat Med **7**(12): 1339-46.

## Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

Abb.	Abbildung
AFM	<i>Atomic force microscope</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
BDCA-4	<i>Blood dendritic cell antigen 4</i>
bp	Basenpaare
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CMV	Zytomegalievirus
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
DC	Dendritische Zelle
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
ds	Doppelstrang
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK ½	Extrazelluläre Rezeptorkinase ½
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HBsAg	<i>Hepatitis B surface antigen</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	Interferon
IFN-R	Typ I IFN-Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IκKε	IκB Kinase ε
IKK	IκB-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>

JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MPS	Mononukleäres phagozytäres System
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation marker 88</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
OAS	2'5' Oligoadenylatzyklase
ODN	Oligodesoxynukleotide
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
Poly G	Poly-Guanin
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
PKR	Ds RNA-aktivierte Serine/Threonin-Proteinkinase
RKM	Rasterkraftmikroskop
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
TBK1	<i>TANK-binding kinase-1</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF6	TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor 6

## Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Endres für die fachliche und persönliche Unterstützung sowie für die Möglichkeit, in der ebenso engagierten wie freundschaftlichen Atmosphäre der Abteilung zu forschen und die Ergebnisse auf Kongressen und in wissenschaftlichen Zeitschriften zu präsentieren.

Für die intensive Betreuung und die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft danke ich Herrn Privatdozent Dr. Gunther Hartmann, der mich durch seine positive Einstellung und seine Begeisterungsfähigkeit für die wissenschaftliche Arbeit motiviert hat.

Ich danke Herrn Dr. Simon Rothenfusser, Herrn Dr. Klaus Heckelsmiller, Herrn Dr. Ralf Jox und Andreas Towarowski für die methodische Anleitung und Einarbeitung. Ich danke allen Laborkollegen, die mich bereitwillig und tatkräftig unterstützten, allen voran Anja Sarris, Julia Battiany, Rosemarie Kiefl und Daniela Wellisch.

Ich danke den wissenschaftlichen Kooperationspartnern insbesondere:

- Prof. Wolfgang Heckl, Dr. Stefan Thalhammer, Lilian T. Costa; Institut für Geo- und Umweltwissenschaften, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Prof. Judith Johnson, Anna Kollar; Institut für Immunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Prof. Andreas Zimmer, Dirk Lochmann, Jörg Weyermann; Institut für pharmazeutische Technologie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt.
- Steffen Englert, Thomas Ketterer Institut für organische Chemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Ich danke allen, die das Manuskript korrigierten insbesondere Claudia Maas, Dr. Simon Rothenfusser, Anja Sarris, Julia Söllner, Philip Schneider und Julia Battiany.

Ich danke meinen Eltern Heribert und Barbara Kerkmann und meiner Schwester Gesa Kerkmann für ihre unschätzbare Hilfe und Unterstützung.



## Veröffentlichungen

### 1. Originalarbeiten

2003:

- **Kerkmann M.**, S. Rothenfusser, V. Hornung, A. Towarowski, M. Wagner, A. Sarris, T. Giese, S. Endres, G. Hartmann:  
*Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells,*  
The Journal of Immunology 2003, 170: 4465-4474.
- Krug A., S. Rothenfusser, S. Selinger, C. Bock, **M. Kerkmann**, J. Battiany, A. Sarris, T. Giese, D. Speiser, S. Endres, G. Hartmann:  
*CpG-A ODN induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells,*  
The Journal of Immunology 2003, Apr 1;170 (7):3468-77.
- Hartmann G., J. Battiany, H. Poeck, M. Wagner, **M. Kerkmann**, N. Lubenow, S. Rothenfusser, S. Endres:  
*Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells,*  
European Journal of Immunology 2003, Jun;33(6):1633-41.

2004:

- Costa L.T., **M. Kerkmann**, G. Hartmann, S. Endres, P.M. Bisch, W.M. Heckl, S. Thalhammer:  
*Structural studies of oligonucleotides containing G-quadruplex motif combined with palindromic sequence using AFM,*  
Biochemical and Biophysical Research Communications 2004, 313, 1062-69
- **Kerkmann M.**, L.T. Costa, C. Richter, S. Rothenfusser, J. Battiany, V. Hornung, J. Johnson, S. Englert, T. Ketterer, W. Heckl, S. Thalhammer, S. Endres, G. Hartmann:  
*Spontaneous formation of nucleic-acid-based nanoparticles is responsible for high IFN-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells*  
The Journal of Biological Chemistry, in Revision
- **Kerkmann M.**, D. Lochmann, J. Weyermann, A. Marschner, Zimmer A., Endres S., Hartmann G.:  
*Immunostimulatory properties of CpG-oligonucleotides are enhanced by the use of protamine-based nanoparticles*  
in Vorbereitung

## 2. Vorträge

- **Kerkmann M.**, K Tschoep, K. Heckelsmiller, M. Delius, S. Endres, G. Hartmann:  
*Shock Waves: a novel method for cytoplasmic delivery of Antisense Oligonucleotides*  
5th International Conference on Cellular Engineering, Aachen, 04.-06.07.2001  
ausgezeichnet mit dem 3. Platz im Rahmen der students competition.

## 3. Posterpräsentationen

- **Kerkmann M.**, S. Rothenfusser, V. Hornung, A. Towarowski, M. Wagner, A. Sarris, T. Giese, S. Endres, G. Hartmann:  
*Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells,*  
90<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association of Immunologists, Denver, USA, 6.-10.05.2003.
- **Kerkmann M.**, A. Sarris, S. Endres, G. Hartmann  
*Regulation of IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by CpG oligonucleotides and CD40-ligand*  
Meeting for Experimental Biology, New Orleans, USA, 20.-24.04.2002.

## Lebenslauf

Name: Miren Kerkmann

Geburtsdaten: 27.06.1974 in Dinslaken

Nationalität: deutsch

1980-1984	Grundschule Xanten (Nordrhein-Westfalen)
1984-1990	katholische Mädchenrealschule Xanten
1990-1993	Stiftsgymnasium Xanten
Juni 1993	Abitur - Stiftsgymnasium Xanten
Oktober 1993	Beginn des Studiums der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
WS 1996/97	Austauschsemester im Rahmen des ERASMUS-Programmes an der Universität Paris-Süd
SS 1997	Austauschsemester im Rahmen des ERASMUS-Programmes an der Universität Santiago de Compostela, Spanien
1998-1999	Praktisches Jahr (dritter Abschnitt des Pharmaziestudiums) 1. Halbjahr: Internationale Apotheke, Flughafen München 2. Halbjahr: Aventis Pharma, Bad Soden, Abteilung: Zulassung
November 1999	3. Pharmazeutisches Staatsexamen, Approbation als Apothekerin
Januar -Juli 2000	Forschungsaufenthalt an der Universität Paris-Süd, Prof. Couvreur, pharmazeutische Galenik. Forschungsprojekt: Einkapselung eines Zytostatikums in Nanopartikel
Seit August 2000	Doktorarbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie ( Prof. S. Endres) Medizinische Klinik Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München