

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Der Einfluss von plasmazytoiden dendritischen Zellen und immunstimulatorischer
DNA auf B-Zellen des humanen Immunsystems

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hendrik Poeck

aus Stuttgart

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Endres
2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Rapaport

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Enders
Prof. Dr. St. K. Bohlander

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. G. Hartmann

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2006

Meiner Familie in Dankbarkeit

 Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Das humane Immunsystem	1
1.1.1	Angeborene und adaptive Immunität	1
1.1.2	Erkennungsmechanismen in Form von "Pattern Recognition Receptors"	1
1.1.3	Die Familie der Toll-Like-Rezeptoren (TLRs)	3
1.1.4	IFN Typ I: Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunität	5
1.2	Dendritische Zellen	5
1.2.1	Dendritische Zellen-Kontrolleure des Immunsystems	5
1.2.2	Die plasmazytoide dendritische Zelle	8
1.2.3	Immunologische Charakterisierung und biologische Funktion der PDC	9
1.2.4	Pathophysiologische Bedeutung: PDC und HIV	13
1.2.5	Pathophysiologische Bedeutung: PDC und Tumore	14
1.3	B-Zellen als Vermittler der humoralen Immunantwort	14
1.3.1	Die Entwicklung der B-Zelle	14
1.3.2	"Ménage à trois"	15
1.3.3	Die Bildung des folliculären Keimzentrums	18
1.3.4	Vom Zentrozyten zur Plasmazelle	19
1.3.5	Die wichtigste Entscheidung: memory B-Zelle oder Plasmazelle	20
1.3.6	Die humane B-Zelle als zweite TLR9 tragende Zelle	20
1.4	CpG-Oligonukleotide als Adjuvanzien in der Immuntherapie	21
1.4.1	Entdeckung der CpG-DNA	21
1.4.2	TLR9 als Erkennungsmechanismus für CpG-Motive	23
1.4.3	Wirkung auf das Immunsystem	24
1.4.4	B-Zellen	24
1.4.4	Dendritische Zellen	25
1.4.6	Differenzierung zweier verschiedener CpG-Klassen	27
1.5	Therapeutischer Einsatz synthetischer Oligonukleotide	28
1.5.1	CpG-DNA als Monotherapie in der Immuntherapie von Tumoren	29
1.5.2	CpG-DNA als Mechanismus der ADCC	29
1.5.3	CpG-DNA als Adjuvans einer Tumorstoffimpfung	30
1.5.4	CpG-DNA und Allergie	30
1.6	Fragestellung	31
2.	Material und Methoden	33
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	33
2.1.1	Geräte	33
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	33
2.1.3	Reagenziensätze	33
2.2	Materialien für die Zellkultur	34
2.2.1	Zytokine und Antikörper	34
2.2.2	Medium und Puffer	34
2.2.3	Antikörper	35
2.3	CpG-Oligonukleotide	35
2.3.1	Primer für die Amplifikation der TLR-kodierenden Gene	36
2.4	Zellulär – immunologische Methoden	37
2.4.1	Zellkulturen	37
2.4.2	Bestimmung von Zahl und Vitalität der Zellen	37
2.4.3	Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut	37
2.4.4	Isolation von plasmazytoiden dendritischen Zellen	38
2.4.5	Isolation von humanen B-Lymphozyten	39

2.4.6	Isolation von naiven und memory B-Lymphozyten.....	40
2.5	Transwell-Experimente	41
2.6	Quantifizierung der Zytokin- und Immunglobulinsekretion mit dem ELISA- Test (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	42
2.6.1	Quantifizierung von Interferon- α	42
2.6.2	Quantifizierung von Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- α	43
2.6.3	Quantifizierung von IgM und IgG	43
2.7	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	44
2.7.1	Allgemeines Funktionsprinzip	44
2.7.2	FACS-Analyse	45
2.7.3	Die Bestimmung der Reinheit von PDC- und B-Zell-Präparationen.....	45
2.7.4	Bestimmung des Plasmazellanteils von humanen B-Zellen.....	46
2.7.5	Zellauftrennung ("Sorten") von humanen B-Zell-Subpopulationen.....	46
2.8	Molekularbiologische Methoden	48
2.8.1	Isolation von RNA aus humanen B-Zellen.....	48
2.8.2	Reverse Transkription von RNA in cDNA.....	49
2.8.3	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Allgemeines Funktionsprinzip	49
2.8.4	<i>Hot-start</i> -Verfahren.....	50
2.8.5	<i>Touch-down</i> -Verfahren.....	50
2.8.6	<i>Real-time</i> -PCR	51
2.9	Statistische Analyse.....	53
3.	Ergebnisse.....	54
3.1	Die Interaktion von plasmazytoider dendritischer Zelle und B-Zelle.....	54
3.1.1	PDCs verstärken die Wirkung von CpG-Oligonukleotiden auf B-Zellen innerhalb von PBMCs	54
3.1.2	PDCs fördern die CpG-ODN-induzierte CD86-Expression auf humanen B-Zellen.....	56
3.1.3	Die Anwesenheit von CpG-stimulierten PDCs führt zu einer erhöhten Zytokinproduktion von humanen B-Zellen.	58
3.1.4	Die Anwesenheit von CpG-stimulierten PDCs führt auch zu einer erhöhten Zytokinproduktion der naiven und memory B-Zellen.....	62
3.1.5	CpG-stimulierte PDCs fördern die Generierung von Plasmazellen.....	64
3.1.6	CpG und PDCs fördern die Generierung von Plasmazellen insbesondere aus Anti-Ig-stimulierten memory B-Zellen	66
3.1.7	CpG-stimulierte PDCs unterstützen die Immunglobulinproduktion humaner B-Zellen.....	68
3.2	Die Suche nach dem Mechanismus.....	71
3.2.1	Die Aktivierung von B-Zellen durch CpG-stimulierte PDCs kommt durch lösliche Faktoren zustande.....	71
3.2.2	IFN- α induziert eine erhöhte Produktion von IL-6, TNF- α und IgM humaner B-Zellen.....	73
3.2.3	Die Expression von TLR7 und TLR9 wird durch IFN- α beeinflusst	76
3.3	TLR-Expressionsmuster von Subpopulationen humaner B-Zellen aus peripherem Blut.....	78
4.	Diskussion	81
4.1	Übersicht über die experimentellen Befunde.....	81
4.2	Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur	83
4.2.1	Die PDC als Ersatz für T-Zell-Hilfe?.....	83
4.2.2	Die T-Zell-unabhängige B-Zell-Entwicklung.....	85
4.2.3	Die Rolle der PDC in der humoralen Immunantwort.....	86

4.3	Mögliche Mechanismen im Hinblick auf die Induktion der adaptiven Immunantwort.....	91
4.3.1	Lösliche Faktoren oder Zell-Zell-Kontakt.....	91
4.3.2	IFN- α inhibiert den "Isotype Switch" von humanen B-Zellen.....	92
4.3.3	BlyS und APRIL	95
4.3.4	Die Rolle von TLR9 bezüglich der Immunstimulation.....	96
4.3.5	Differenzielle TLR-Expression in humanen B-Zell-Subpopulationen.....	98
4.3.6	Effekte von BCR-Ligation und CpG-Stimulation auf die TLR-Expression von humanen B-Zellen	99
4.4	PDCs und CpG-ODN: Unterstützer einer polyklonalen oder Antigen-spezifischen Immunantwort ?.....	101
4.4.1	Mikrobielle DNA unterscheidet sich von CpG-DNA	101
4.5	Das neue CpG-C-Oligonukleotid.....	104
4.5.1	Drei verschiedene CpG-Klassen: charakterisiert durch ihre primären Zielzellen.....	104
4.5.2	Nur CpG-B stimuliert die B-Zelle.....	105
4.5.3	CpG-A und CpG-B induzieren eine qualitativ unterschiedliche Antwort der PDC.....	106
4.5.4	CpG-C aktiviert B-Zelle und PDC.....	106
4.5.5	Strukturelle Unterschiede der drei CpG-Klassen.....	107
4.5.6	Unterschiede in der Aufnahme der drei CpG-Klassen.....	108
4.6	Klinische Relevanz der Ergebnisse	109
4.6.1	Von Maus zu Mensch	109
4.6.2	Klinische Bedeutung der unterschiedlichen Klassen	110
4.6.3	TLR9-Inhibition als möglicher Mechanismus zur Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen	110
4.6.4	Die Rolle der PDC und IFN- α bei Autoimmunerkrankungen	111
5.	Zusammenfassung	115
6.	Literaturverzeichnis	118
7.	Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme.....	133
8.	Danksagung	136
9.	Publikationen	137
10.	Lebenslauf	139

1. Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem

1.1.1 Angeborene und adaptive Immunität

Der Mensch ist ständig der Gefahr ausgesetzt, durch Mikroorganismen aus seiner Umgebung oder pathologisch transformierte eigene Zellen, in seiner Unversehrtheit gestört zu werden. Der Ausdruck "Immunität" bezeichnet die allgemeine Fähigkeit eines Wirtsorganismus, dem Eindringen von Mikroorganismen entgegenzuwirken, die den Wirt sonst schädigen. Das Immunsystem muss dabei in den Körper eindringende fremde Substanzen und fremde Substanzen auf Zellen, so genannte Antigene, erkennen und ausschalten, ohne die körpereigenen Strukturen anzugreifen. Die Unterscheidung von "selbst" und "fremd", worunter auch pathologisch veränderte eigene Zellen wie Tumorzellen und virusinfizierte Zellen verstanden werden, ist eine der faszinierendsten und wichtigsten Fähigkeiten des Immunsystems. Das Immunsystem hat viele Facetten, wobei die größte Dichotomie in der traditionellen Unterscheidung von adaptiver (erworben) und angeborener (natürlicher) Immunität liegt. Das adaptive Immunsystem wird durch zwei Klassen spezialisierter Zellen vertreten, den B- und T-Lymphozyten. Die angeborene Immunität wird insbesondere durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) wie Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen (DCs) repräsentiert.

1.1.2 Erkennungsmechanismen in Form von "Pattern Recognition Receptors"

Schon 1960 postulierten mehrere Arbeitsgruppen eine funktionelle Abhängigkeit der adaptiven von der angeborenen Immunantwort^{1, 2}. Diese Arbeiten zeigten, dass mononukleäre, phagozytierende Zellen nach einer Stimulation mit Antigen essentiell für die Auslösung einer effektiven adaptiven lymphozytären Immunantwort sind. Heute weiß man, dass diese funktionelle Abhängigkeit vor allem auf dem Phänomen der Antigenpräsentation beruht, einer Funktion, die vornehmlich von Antigen-präsentierenden Zellen, einschließlich verschiedener Subpopulationen von DCs, wahrgenommen wird. Ferner gab es in den erwähnten Studien Hinweise darauf, dass für die Erkennung bestimmter mikrobieller Moleküle, die zur initialen Aufnahme und Phagozytose von Mikroorganismen durch APCs führten, spezifische Rezeptoren verantwortlich sein könnten.

Konsequenterweise ist eine der aktuellsten und wichtigsten Erkenntnisse der Immunologie, wie das angeborene Immunsystem infektiöse Mikroorganismen detektieren und diese gleichzeitig voneinander differenzieren kann. Diese Eigenschaft des angeborenen Immunsystems ist von großem Nutzen, denn der Schutz gegen diverse Pathogene erfordert, dass zwar jeweils unterschiedliche, aber passende Immunantworten initiiert werden. Handelt es sich z.B. um einen extrazellulären Parasiten, dann muss das angeborene Immunsystem die Auslösung einer Immunantwort ermöglichen, die sowohl eine Aktivierung von eosinophilen Granulozyten, als auch die Produktion von Zytokinen (IL-4, IL = Interleukin) und Immunglobulinen (IgE, Ig = Immunglobulin) beinhaltet. Diese Art der Immunantwort wird T_H2 -Antwort genannt. Im Gegensatz dazu erfordert eine intrazelluläre virale Infektion eine Immunantwort, die T_H1 -Antwort genannt wird. Hierbei werden zuerst natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aktiviert, welche die Infektion so lange kontrollieren, bis spezifische $IFN-\gamma$ (IFN = Interferon) sezernierende $CD4^+$ T-Zellen und zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen gebildet werden können.

Obwohl die Details dieser spezifischen Aktivierung bis heute nicht eindeutig geklärt sind, glaubt man, dass das Immunsystem dieser Aufgabe in einer überraschend einfachen Weise mittels so genannter "pattern recognition receptors" (PRRs) gerecht wird. Diese PRRs werden von vielen verschiedenen Effektorzellen der angeborenen Immunität exprimiert, insbesondere von Antigen-präsentierenden Zellen, das sind Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten. Nach Erkennung eines mikrobiellen Moleküls können diese Zellen eine spezifische Zellaktivierung auslösen. Auch Zellen der adaptiven Immunität wie humane B-Zellen besitzen diese Rezeptoren. Die PRRs erkennen somit einige hoch-konservierte Strukturen, die vielen Mikroorganismen gemeinsam sind, die so genannten "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs)³. Diese Moleküle, zu denen Peptidoglykane, Polysaccharide, Zymosan, Lipopolysaccharide, und unmethylierte CpG-Dinukleotide zählen, wurden früher als unspezifische Immunmodulatoren angesehen.

Heute ist jedoch bekannt, dass diese PAMPs von zellspezifischen Rezeptoren erkannt werden und folglich spezifische Immunantworten auslösen können. Die Identifizierung der Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) als Rezeptoren für Moleküle mikrobiellen Ursprungs hat neues Licht in das Zusammenspiel von angeborener und adaptiver Immunität gebracht.

1.1.3 Die Familie der Toll-Like-Rezeptoren (TLRs)

Die am besten charakterisierte Familie der PRRs stellt die Familie der TLRs dar, von denen im humanen System zehn unterschiedliche Typen identifiziert worden sind ³. Diese TLRs haben sowohl unterschiedliche Eigenschaften als auch verschiedene zelluläre Lokalisationen. So wird TLR4 an der Zelloberfläche sowohl von humanen myeloïden DCs (MDC), einer Subpopulation dendritischer Zellen, als auch von Monozyten exprimiert und ist essentiell für die Erkennung von Lipopolysacchariden (LPS), einem Bestandteil gram-negativer Bakterien. Im Gegensatz dazu scheint TLR9 im endosomalen Kompartiment der plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC), einer weiteren Subpopulation von DCs, und B-Zellen ⁴ vorzukommen und vornehmlich für die Erkennung viraler und bakterieller DNA verantwortlich zu sein ⁵.

Die meisten Immunzellen besitzen unterschiedliche TLR-Expressionsmuster ⁵⁻⁸. So besitzen MDCs TLR4 und TLR7, während PDCs TLR7 und TLR9 exprimieren. Wenn man nun beispielhaft nur diese DC-Subpopulationen berücksichtigt, wird ein TLR4-Ligand nur MDCs, aber nicht PDCs aktivieren. Ein TLR9 Ligand wird hingegen PDCs, aber nicht MDCs aktivieren. Ein TLR7-Ligand wird in der Lage sein, beide Zelltypen zu aktivieren. Die myeloïde und die plasmazytoïde DC reagieren jedoch sehr unterschiedlich auf TLR-Stimulation, was unterschiedliche Funktionen der TLRs annehmen lässt. So sezernieren aktivierte MDCs hohe Mengen an IL-12 und proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α (TNF = Tumor-Nekrose-Faktor), während die PDCs hohe Level an IFN- α produzieren. Diese Zellen sind für den Großteil der IFN- α -Produktion während einer Virusinfektion verantwortlich ⁹. TLR7-Liganden wie z.B. Imidazolquinolone induzieren beide Zytokinprofile ^{9,10}, können aber auch humane Immunzellen mittels TLR8 aktivieren und so zu komplexen Immunantworten führen ¹¹. Darüber hinaus ist TLR9 verantwortlich für die IFN- α Produktion. Allgemein formuliert kontrolliert IFN- α während einer Virusinfektion die virale Replikation. Dies geschieht jedoch nicht nur über Mechanismen der angeborenen Immunität, sondern auch Mechanismen der adaptiven Immunität wie der Aktivierung von NK-Zellen, der Auslösung einer T_H1-Antwort ¹² sowie der Produktion von Antikörpern ¹³. Wie es über eine Stimulation dieser TLRs jedoch zu diesen unterschiedlichen Immunantworten kommt, ist noch nicht geklärt.

Ein Erklärungsansatz liegt in den Ähnlichkeiten und Differenzen der Signaltransduktion der verschiedenen TLRs. So werden die beobachteten Immunantworten nach Stimulation von TLR7 und TLR9 durch das Adaptorprotein MyD88 (myeloid differentiation factor 88) vermittelt, wohingegen eine TLR4-Aktivierung unterschiedliche Adaptorproteine benötigt (in diesem Fall MyD88 und TIRAP (Toll–interleukin/1 receptor–adaptor protein)¹⁴. Erst kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass TLR4 sogar MyD88-unabhängig über TRIF (TRIF = *TIR domain-containing adapter inducing IFN- β*) signalisieren kann¹⁵. Somit befähigen die Differenzen in der molekularen Signaltransduktion der TLRs sowie die zellspezifische TLR-Expression und Lokalisation das angeborene Immunsystem, eine auf das Antigen abgestimmte Immunantwort auszulösen und eine intensive Verknüpfung von adaptiver und angeborener Immunantwort herzustellen. Für einen Überblick zu dem aktuellen Wissen über bekannte TLR-Agonisten sei auf Tabelle 1.1 beziehungsweise entsprechende Übersichtsartikel verwiesen^{16,17}.

TLR	Liganden	Pathogene	Referenz
TLR1	kooperiert mit TLR2		
TLR2	Lipoproteine	Gram-positive Bakterien	¹⁸
	Zyotoxin	Hefen	¹⁹
	LAM	Mykobakterien	²⁰
TLR3	doppelsträngige RNA	Viren	²¹
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien	²²
	Protein F	RSV	²³
TLR5	Flagellin		²¹
TLR6	kooperiert mit TLR2		²⁴
TLR7	Gunaosin-Analoga	ssRNA, siRNA	^{25, 26}
TLR8	Gunaosin-Analoga	nicht bekannt	¹¹
TLR9	CpG-Motive	Bakterien, Viren	⁵
TLR10	Nicht bekannt	nicht bekannt	

Tabelle 1.1 Humane Toll-Like-Rezeptoren und ihre Liganden

1.1.4 IFN Typ I: Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunität

1957 wurde Interferon von Isaacs und Lindenmann als ein Protein beschrieben, das in lebenden Zellen durch Stimulation mit hitzeinaktivierten Influenzaviren induziert wird²⁷. Die Zugabe dieses Proteins zu virusinfizierten Zellen interferiert mit der viralen Replikation, so dass der Name Interferon geprägt wurde. Seit seiner Entdeckung zeigte sich, dass mehrere IFN-Subtypen existieren, so dass man heute von einer Proteinfamilie sprechen kann. Interferone, die man in IFN Typ I und IFN Typ II einteilt, werden von verschiedenen Zellen produziert und binden an unterschiedliche Rezeptoren^{28,29}. IFN- γ ist der einzige Vertreter des IFN Typ II und wird hauptsächlich von T-Zellen oder NK-Zellen gebildet, die durch Antigene oder Zytokine stimuliert wurden. Dieses IFN wurde intensiv sowohl in normalen als auch in pathologischen Immunantworten untersucht und wird heute als das wichtigste immunregulatorische Protein der IFN-Familie angesehen³⁰. Die Familie des IFN Typ I, die sich aus mindestens 13 verschiedenen IFN- α -Subtypen, einem IFN- β und einem IFN- ω zusammensetzt, wird hauptsächlich als antivirale Proteinklasse angesehen, da sie besonders im Rahmen einer viralen Infektion gebildet wird und virale Resistenz in Zielzellen bewirkt. Typ I Interferone werden rasch auf mikrobielle Stimuli hin sezerniert und aktivieren eine Vielzahl von Effektorzellen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems. IFN Typ I verhindert unter anderem direkt die Virusreplikation in infizierten Zellen²⁷, steigert die Zytotoxizität von Makrophagen und NK-Zellen³¹, fördert die Proliferation von Gedächtnis T-Zellen durch die Induktion von IL-15³², erhält aktivierte T-Zellen am Leben³³ und begünstigt ferner Antikörperproduktion durch B-Zellen³⁴. Im besonderen ist IFN Typ I unabdingbar in der Induktion einer effektiven antiviralen Immunität³⁵ und spielt die entscheidende Rolle in der Immunantwort gegen Bakterien und Protozoen³⁶.

1.2 Dendritische Zellen

1.2.1 Dendritische Zellen-Kontrolleure des Immunsystems

Das Immunsystem wird von dendritischen Zellen (DCs) kontrolliert. DCs liegen in nahezu allen peripheren Geweben des Körpers in einem dichten Netzwerk vor und analysieren ihre Umgebung, indem sie extrazelluläre Bestandteile durch Phagozytose und Endozytose aufnehmen, diese prozessieren und als Peptide auf ihrer Oberfläche im MHC-Kontext (MHC = *major histocompatibility complex*) präsentieren. Potentielle

antigene Bestandteile der Umgebung werden somit „sichtbar“ für T-Zellen gemacht, die erst durch Präsentation prozessierter Peptide im MHC-Kontext in der Lage sind, Antigene zu erkennen. Jeglicher Kontakt mit einem Gefahrensignal veranlasst die DCs, das Gewebe zu verlassen und in den drainierenden Lymphknoten auszuwandern. Dort interagieren sie in T-Zell-Arealen mit T-Zellen. In Abhängigkeit von ihrem Aktivierungsgrad sind sie in der Lage, entweder Toleranz gegenüber dem präsentierten Antigen zu induzieren oder eine spezifische T-Zell-Immunantwort zu initiieren. Die Induktion einer adaptiven Immunantwort wird erst dadurch erreicht, dass T-Zellen erstens ihr spezifisches Antigen auf der DC im MHC-Kontext erkennen (Signal I) und zweitens durch weitere kostimulatorische Moleküle der DC aktiviert werden (Signal II).

Die Entwicklung der *in vitro* Zellkultursysteme, in welchen große Mengen an DCs generiert werden können, beschleunigte die Studien über ihre Biologie und deren Komplexität. Tatsächlich haben DCs in ihren verschiedenen Entwicklungsstadien unterschiedliche Funktionen. Während unreife (sich entwickelnde) DCs für die Aufnahme von apoptotischen Zellen und die Toleranzinduktion zuständig sind^{37, 38}, induzieren reife antigen-präsentierende DCs eine Antigen-spezifische Immunität³⁹. Eine zusätzlich komplizierende Entdeckung ist die Existenz verschiedener DC-Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen^{40, 41}.

Im humanen System lassen sich zumindest phänotypisch zwei verschiedene DC-Subpopulationen des peripheren Blutes unterscheiden: die myeloide unreife CD11c⁺ DC (MDC) und die CD11c⁻ plasmazytoide DC (PDC). Hier muss jedoch erwähnt werden, dass die Herkunft der unterschiedlichen DC-Subtypen derzeit Gegenstand reger Diskussion ist. Die Gruppe um Jaques Bancheraux hat ein Modell vorgeschlagen, in dem die myeloide DC-Subpopulation sowohl die Langerhans-Zellen (LC), die in der Epidermis gefunden werden, als auch die folliculären dendritischen Zellen, die vorwiegend in lymphatischen Geweben gefunden werden, einschliesst. Während beide DC-Typen IL-12 produzieren, sezernieren vorwiegend folliculäre DCs IL-10 und leiten eine B-Zell-Differenzierung ein⁴². Der lymphoide Hauptweg schließt die PDC ein, die nach Virusstimulation große Mengen an IFN Typ I sezerniert^{43, 44}. Darüber hinaus modulieren PDCs, abhängig vom Reifungssignal, das sie empfangen, die T-Zell-Entwicklung entweder in Richtung IFN- γ oder IL-4 sezernierender T-Zellen⁴³ oder gar in regulatorische T-Zellen⁴⁵.

Die Expression lymphoider Marker in PDCs, jedoch nicht in MDCs, lässt vermuten, dass DCs entweder von lymphoiden oder myeloiden Vorstufen abstammen. Weiterhin hat sich gezeigt, dass diese zwei DC-Populationen unterschiedliche Profile an PRRs exprimieren, was zu der Annahme geführt hat, dass sich diese DCs im Laufe der Evolution darauf spezialisiert haben, unterschiedliche Pathogene zu erkennen⁴⁶.

Die Kontrolle der Immunantwort ist ziemlich komplex. DCs nehmen in ihrer Rolle als "Immunmodulatoren" nicht nur Virusantigen oder Fremdartigen, sondern auch körpereigenes Antigen auf. So können DCs zum Beispiel Influenzavirusantigen aufnehmen und die mikrobiellen Antigene an Immuneffektorzellen präsentieren, um eine adaptive Immunität auszulösen. Gleichzeitig sind DCs dazu befähigt, "Toleranz" zu induzieren. Daher muss es einen Mechanismus geben, der nicht nur die Eliminierung von virusinfizierten Zellen zulässt, sondern auch das Immunsystem davon abhält, sich selbst anzugreifen. Zwei Mechanismen sind dazu gefunden worden und beide werden von DCs kontrolliert. Die so genannte "zentrale Toleranz" findet im Thymus statt, wo neu entstandene T-Zellen, die mit ihrem T-Zell-Rezeptor eine spezielle Komponente auf reifen Thymus-DCs erkennen, sofort eliminiert werden. Trotzdem können körpereigene Antigene auch den Thymus umgehen. Daher ist der Nutzen einer so genannten "peripheren Toleranz", die in den lymphatischen Organen eher durch die Induktion von T-Zell-Anergie als durch T-Zell-Deletion stattfindet, von großer Bedeutung.

Die Entwicklung von "peripherer Toleranz" wird von unreifen DCs bewerkstelligt³⁸. Diese in allen lymphatischen Geweben vorhandenen DCs nehmen die Reste der durch physiologischen Zelltod zu Grunde gegangenen Zellen auf. Da bei diesem Prozess keine Entzündung stattfindet, bleiben die DCs unreif. Diese unreifen DCs, die fast keine kostimulatorischen Moleküle exprimieren, präsentieren die Gewebsantigene an autoreaktive T-Zellen, die in Abwesenheit einer Kostimulation in das Anergie-Stadium eintreten. Daher kann man annehmen, dass eine zunehmend reife DC in Autoimmunität enden kann⁴⁷.

Somit spielen DCs eine tragende Rolle in der Aufrechterhaltung von Toleranz. Konsequenterweise rücken diese Beobachtungen die DC in den Mittelpunkt der adaptiven Immunität - ist es doch sie, die mittels ihrer kostimulatorischen Fähigkeit über Anergie oder Aktivierung "entscheidet".

Die Regulation dieses Mechanismus wurde lange nicht verstanden, und erst in den letzten Jahren bewahrheitete sich durch die bereits erwähnte Charakterisierung der PRRs die Hypothese der Verknüpfung von angeborener und adaptiver Immunität. So zeigte sich, dass eine effektive Aktivierung bzw. Ausreifung von DCs und anschließende Induktion einer Immunantwort hauptsächlich durch eine Stimulation mit mikrobiellen Bestandteilen erreicht wird⁴⁸. Wie oben schon dargestellt, wird der Erkennungsprozess von potentiellen Gefahrensignalen durch die PRRs erreicht, welche hoch-konservierte PAMPs erkennen. Es ist somit nicht verwunderlich, dass DCs ein breites Spektrum an PRRs exprimieren, welches bis zu den bereits erwähnten TLRs reicht^{49, 50}. Neben der Fähigkeit eine adaptive Immunantwort zu induzieren, sind DCs ferner in der Lage, unmittelbar auf einen pathogenen Stimulus durch Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen zu reagieren. So tragen sie auch dazu bei, dass weitere Immunzellen zum Herd der Infektion gelangen⁵¹.

1.2.2 Die plasmazytoide dendritische Zelle

1958 beschrieben die Kieler Pathologen K. Lennert und W. Remmele im lymphatischen Gewebe eine neue Population von so genannten "Lymphoblasten"⁵². Später nannte dieselbe Forschergruppe diese Zelle "T-Zell-assoziierte Plasmazelle", da sie elektronenmikroskopisch morphologische Ähnlichkeiten zur Plasmazelle aufwies und in den T-Zell-Zonen des lymphatischen Gewebes gefunden wurde⁵³. Die Funktion und Herkunft dieser Zelle blieb jedoch lange ungeklärt, obwohl das reichlich ausgeprägte endoplasmatische Retikulum schon früh auf eine sezernierende Tätigkeit hinwies. Als Sekretionsprodukt wurden Immunglobuline und Lymphokine vermutet⁵⁴. Genauere immunhistochemische Untersuchungen der "*plasmazytoiden T-Zelle*" von der Arbeitsgruppe um Facchetti ergaben jedoch, dass diese myelomonozytäre Oberflächenmoleküle wie CD31, CD36, CD68 und die IL3-Rezeptor- α -Kette exprimiert, welches zu einer Umbenennung dieses Zelltyps in "*plasmazytoider Monozyt*" führte⁵⁵.

Ein zweiter Hinweis kam aus dem Forschungsfeld der DCs, welche 1973 von Steinman und Mitarbeitern an der Rockefeller Universität in New York entdeckt wurden⁵⁶. 1994 gelang es dieser Arbeitsgruppe, zwei unterschiedliche Subpopulationen von DCs (CD11c⁺ und CD11c⁻) unter CD4⁺ DCs im peripheren Blut zu identifizieren⁵⁷. Liu und Mitarbeiter konnten schließlich 1997 zeigen, dass die "*plasmazytoide T-Zelle*" identisch

ist mit der schon 1994 beschriebenen $CD4^+$ und $CD11c^-$ Vorläufer-DC des peripheren Blutes⁵⁸. Diese Ergebnisse wurden unterstützt durch die Entdeckung, dass eine große Anzahl von DC-Subtypen sich in den T-Zell-Zonen der lymphatischen Organe aufhalten und sich durch eine hohe Expression der IL-3-Rezeptor- α -Kette (CD123) auszeichnen⁵⁹.

Unabhängig von diesen Erkenntnissen wurde schon lange angenommen, dass es einen Hauptzelltyp geben muss, der in der Lage ist, auf eine Virusinfektion hin IFN Typ I zu produzieren⁶⁰. Diese so genannten Interferon-produzierenden Zellen (IPC) waren jedoch *lineage negativ*, d.h. negativ für Oberflächenmarker und Eigenschaften der klassischen hämatopoetischen Stammreihen (T-, B-, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen), jedoch positiv für CD4 und MHC-II^{61, 62}. Die Forschergruppe um Alm konnte weitere wichtige Informationen liefern, indem sie zeigte, dass sich die IPC in Folge einer Herpes-Simplex-Virusinfektion in einer kleinen Population (1,4% innerhalb der mononukleären Zellfraktion des peripheren Blutes (PBMC)) von $CD3^-$ und $CD4^+$ -Zellen des peripheren Blutes befinden⁶³. Es wurde lange kontrovers diskutiert, ob diese natürliche IPC einer eigenständigen *lineage* zuzuordnen sei⁶² oder ob es sich hier um eine DC handle^{61, 64}. Erst 1999 fanden zwei Forschergruppen um Liu und Colonna unabhängig voneinander heraus, dass die IPC identisch ist mit den IL-3 abhängigen „*plasmazytoiden Monozyten*“ aus dem lymphatischen Gewebe und den IL-3-abhängigen Vorläufer DCs aus dem peripheren Blut. Somit war aus dem „*plasmazytoiden Monozyten*“ zuletzt die plasmazytoide dendritische Zelle (PDC) geworden^{44, 65}. Derzeit werden synonym mit dem Begriff PDC sowohl IPC als auch DC2 (im Gegensatz zu den MDC = DC1) benutzt.

1.2.3 Immunologische Charakterisierung und biologische Funktion der PDC

Die PDC exprimiert sowohl myeloide als auch lymphoide Oberflächenmoleküle. Im Einverständnis mit ihrem myeloiden Ursprung wurden PDCs *in vitro* mit IL-3 stimulierten $CD34^+$ Vorläuferzellen kultiviert, die ebenfalls den Rezeptor für den Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (M-CSF) tragen⁵⁹. Auf der anderen Seite unterstützen die Beobachtungen, dass PDCs die typischen myeloiden Oberflächenmoleküle wie CD11c, CD13 und CD33 nicht exprimieren, jedoch gleichzeitig positiv sind für die T-Zell-spezifischen Marker CD45RA, CD3 ϵ und den B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor

Spi-B, die Hypothese ihres lymphoiden Ursprunges^{66, 67}. Trotzdem ist ihr phylogenetischer Ursprung bis dato noch nicht eindeutig geklärt. Comeau unterteilt die plasmazytoiden dendritischen Zellen in drei Subtypen, von denen zwei lymphoiden und einer myeloiden Ursprungs ist⁶⁸. Nur die beiden PDC-Subtypen lymphoiden Ursprungs besitzen die Fähigkeit, hohe Mengen an IFN Typ I 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-4⁶⁹. Sie ermöglichte die Identifizierung der PDC und erlaubte eine einfache Isolation dieser Zellen. BDCA-4 wird jedoch auch auf DCs exprimiert, die aus Monozyten und aus CD34⁺ Stammzellen generiert werden. Die Expression von BDCA-2 nimmt mit der Reifung der PDC ab, außerdem wird BDCA-2 auch von kortikalen Thymozyten exprimiert⁶⁹. Für eine Übersicht der verschiedenen DC-Subpopulationen und ihrer immunologischen Charakterisierung siehe **Abbildung 1.1**.

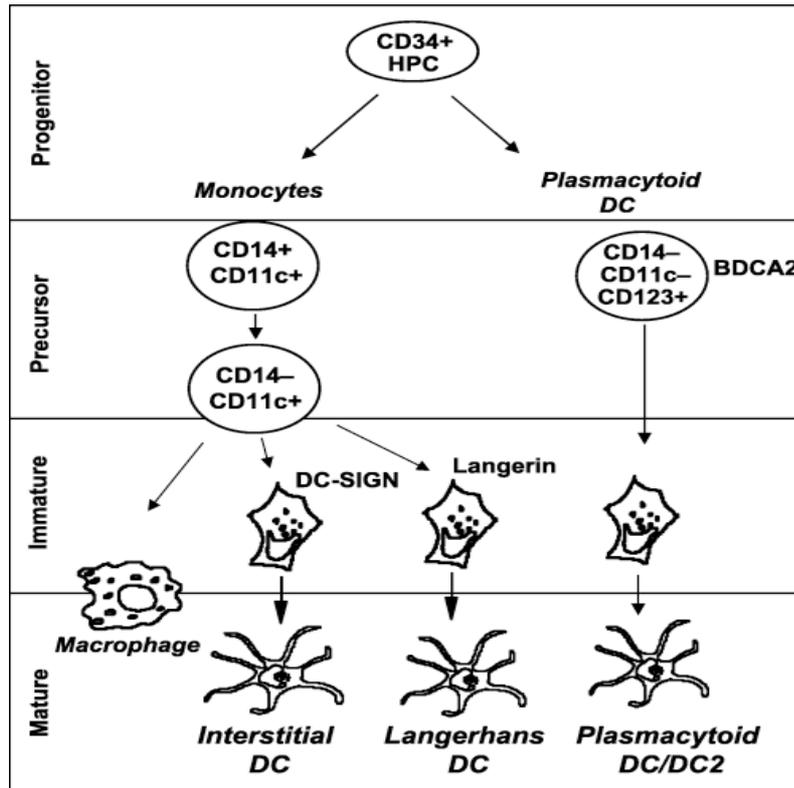


Abbildung 1.1 Subpopulationen humaner dendritischer Zellen und ihre Phänotypen

Aus CD34+ hämatopoetischen Stammzellen gehen Monozyten hervor, welche ein großes Reservoir an antigen-präsentierenden Vorläuferzellen darstellen und den Weg in Richtung der myeloiden Differenzierung einschlagen können. Abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu können sich CD11c⁺ Zellen entweder in folliculäre („interstitielle“) DCs, Langerhans DCs oder Makrophagen entwickeln. Aus CD11c⁻ Vorläuferpopulationen können BDCA-2 exprimierende PDCs hervorgehen (Palucka, AK. The interplay of dendritic cell subsets in systemic lupus erythematosus, *Immunology and Cell Biology* 2002; (80): p. 484-488).

Die plasmazytoiden dendritischen Zellen stellen eine äußerst seltene Population des peripheren Blutes dar. Die Häufigkeit innerhalb der mononukleären Zellfraktion des peripheren Blutes beläuft sich auf 0,1-0,7%. PDCs kommen gehäuft in sekundären lymphatischen Organen vor, wo sie in der T-Zell-Region nahe der HEV (*high endothelial venules* = postkapilläre Venolen mit hohem Endothel) lokalisiert sind^{69, 70}. Das Vorkommen der PDC in gesunder Haut und Mukosa ist eher selten⁷¹.

In letzter Zeit wird die PDC hinsichtlich ihrer Fähigkeit auf unterschiedliche mikrobielle Stimuli zu reagieren häufig mit anderen DCs verglichen. So reagierten PDCs auf Stimulation mit immunstimulatorischer DNA, so genannte „CpG-DNA“, mit hohen Mengen an Typ I IFN, während MDCs auf andere Stimuli wie LPS, aber nicht auf CpG-DNA reagierten^{8, 72, 73}. Somit wird die PDC auf Grund ihres spezifischen TLR-

Expressions-musters nicht durch jegliche Art von pathogenen Bestandteilen aktiviert, sondern reagiert selektiv nur auf bestimmte Stimuli. In weiteren Studien zeigte sich, dass TLR9 für die Erkennung von CpG-Motiven nötig ist^{5, 6}. Die Analyse von PDCs und MDCs aus dem peripheren Blut ergaben, dass die TLR-Expression in PDCs vornehmlich auf TLR7 und TLR9 beschränkt ist. Die CD11c⁻ PDCs exprimieren desweiteren geringe Mengen an TLR10, TLR6 und TLR1. Im Gegensatz dazu exprimieren die CD11c⁺ MDCs eine große Vielfalt an TLRs (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR8). Sie exprimieren jedoch kein TLR9^{7, 49}. Die Konsequenz daraus war, dass sich nur die PDC direkt mit CpG-DNA stimulieren ließ, während MDCs auf andere Stimuli wie LPS, aber nicht auf CpG-DNA reagierten.

Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass Imidazoquinoline, ein Ligand des TLR7-Rezeptors, ebenfalls direkt zu einer Aktivierung der PDC führte^{10, 74}. Ein biologisches Pendant wurde bis dato jedoch nicht identifiziert. Diese Ergebnisse unterstützten desweiteren die Hypothese, dass PDCs die Fähigkeit besitzen, potenzielle Krankheitserreger anhand charakteristischer PAMPs zu erkennen und eine auf die Bekämpfung des entsprechenden Erregers abgestimmte Immunantwort hervorzurufen.

Demzufolge stellt die PDC ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort dar⁷⁵. Die Aktivierung unreifer PDCs durch virale und bakterielle Stimuli führt zu einer Steigerung der Expression von kostimulatorischen Molekülen sowie zur Ausschüttung von Zytokinen. Hierbei kommt insbesondere den Typ I Interferonen eine wichtige Rolle zu^{65, 76}. 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- α pro Zelle). Die Typ I Interferone spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion einer T_H-1 Antwort von humanen T-Helferzellen^{76, 77}. Die PDC ist diesbezüglich nach Stimulation mit CpG-DNA und CD40-Ligand in der Lage die Induktion einer T_H-1 Antwort mittels IL-12 noch zu steigern⁵⁰. Eine interessante Studie konnte sogar belegen, dass PDC bei der Entwicklung von IL-10 produzierenden CD8 T-Zellen eine Rolle spielen⁴⁵. Diese haben jedoch eine geringe zytotoxische Aktivität und zeigen nur eine geringe Proliferation. Weitere Zytokine und Chemokine, die von aktivierten PDCs sezerniert werden, sind IL-6, TNF- α und IL-8.

Überraschenderweise konnte erst kürzlich in einer neuen Studie gezeigt werden, dass auch PDCs in die Differenzierung von CD40L-stimulierten (CD40L = CD40-Ligand)

B-Zellen eingreifen können⁷⁸. Das passte zu der Beobachtung von der Arbeitsgruppe von Le Bon, dass IFN- α die Induktion einer B-Zell-Antwort, einschließlich Proliferation und einem Immunglobulinklassen- oder Isotypwechsel ("Isotype Switch"), unterstützt³⁴.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass PDCs durch die Ausschüttung von Zytokinen und über interzelluläre Wechselwirkungen eine Vielzahl von anderen immunkompetenten Zellen, wie Makrophagen, NK-Zellen, T-Zellen und B-Zellen aktivieren können^{45, 75, 79}. Die Aktivierung der unreifen PDC führt zu ihrer Ausreifung, die mit einem Verlust der Fähigkeit, IFN- α zu produzieren, einhergeht. Die reife PDC ist durch eine dendritische Morphologie gekennzeichnet. Reifen PDCs allerdings nicht in mikrobieller Umgebung, sondern in Gegenwart von IL-3 aus, so können sie eine T_H2-Antwort induzieren⁸⁰. Ob die PDC als professionelle APC bezeichnet werden kann, ist umstritten. Es gibt einige Hinweise, dass PDCs die Immunantwort weiter fördern könnten, indem sie Antigene in der Peripherie (z.B. im Blut) aufnehmen und diese T-Zellen im Lymphknoten präsentieren. Aufgrund der Expression des Oberflächenmoleküls BDCA-2 (BDCA = Blood Dendritic Cell Antigen) könnten PDCs in der Lage sein, Antigen aufzunehmen und zu präsentieren⁶⁹. So besitzt die PDC die Fähigkeit, nach einer Infektion mit Influenza-Virus, Antigen zu präsentieren und Antigen-spezifische zytotoxische CD8-T-Zellen und T_H1-T-Zellen zu expandieren⁸¹. Vergleicht man die PDC jedoch mit MDC, so ist ihre antigen-präsentierende Fähigkeit äußerst gering. Im Gegensatz zu MDCs 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-Zellen⁸².

1.2.4 Pathophysiologische Bedeutung: PDC und HIV

Obwohl die protektive Rolle der Typ I Interferone des Organismus gegenüber Virusinfektionen wohlbekannt ist, scheint die PDC in der Pathogenese von HIV-Infektionen (HIV = *human immunodeficiency virus*) eine zentrale Rolle zu spielen.

Die PDC exprimiert CD4 sowie die HIV-Korezeptoren CXCR4 und CCR5 und wird von dem HI-Virus infiziert⁸³. Die Reduktion der Anzahl von PDCs und der Verlust ihrer Fähigkeit, INF- α zu produzieren, geht bei einer HIV-Infektion einher mit einer erhöhten Viruslast und einer Zunahme an opportunistischen Infektionen^{84, 85}. Bei HIV-

infizierten Langzeitüberlebenden konnte eine erhöhte Anzahl an PDCs detektiert werden. Das Wiedererscheinen von PDCs nach antiretroviraler Therapie geht mit einer verringerten Inzidenz von opportunistischen Infektionen einher^{85,86}.

1.2.5 Pathophysiologische Bedeutung: PDC und Tumore

Da Typ I Interferone die Proliferation von bestimmten Tumoren inhibieren, liegt die Vermutung nahe, dass PDCs bei der antitumoralen Immunantwort eine Rolle spielen könnten. So konnte die Arbeitsgruppe von Zou et al. zeigen, dass PDCs in peritumorale Bereiche von Ovarialtumoren rekrutiert werden und dort, möglicherweise durch eine Sezernierung von IL-10 durch den Tumor selbst, in ihrer Fähigkeit eine Tumor spezifische Immunantwort durch eine T-Zell-Aktivierung zu induzieren, unterdrückt werden⁸⁷. In diesem Zusammenhang führte eine weitere wichtige Studie unserer Arbeitsgruppe zu der Entdeckung von PDCs in Kopf-Hals-Tumoren. Auch hier konnte eine verringerte IFN- α -Produktion von PDCs durch den Tumor nachgewiesen werden⁸⁸.

1.3 B-Zellen als Vermittler der humoralen Immunantwort

1.3.1 Die Entwicklung der B-Zelle

Beim Menschen und bei der Maus erkennt man die verschiedenen Stadien der B-Zellentwicklung an aufeinander folgenden Schritten der Umordnung ihrer Immunglobulingene und an der unterschiedlichen Expression von Molekülen in der Zelle und auf ihrer Oberfläche. Die ersten B-Zellen entwickeln sich in der fetalen Leber; nach der Geburt setzt sich der Prozess im Knochenmark fort.

Die frühesten Zellen der B-Linie nennt man Pro-B-Zellen. Sie sind Vorläuferzellen, die sich nur begrenzt selbst erneuern können. Sie stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab und zeichnen sich durch typische Proteine auf ihrer Oberfläche aus. Über Genumlagerungen der schweren H- (H = "Heavy") sowie leichten L- (L = "Light") Kette gelangt man zur Prä-B-Zelle. Diese Prä-B-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche schon eine vorübergehende Form des Prä-B-Zell-Rezeptors (BCR = B-Zell-Rezeptor). Die Expression des Prä-B-Zell-Rezeptors signalisiert der Zelle, das Genrear-

rangement weiter zu beschleunigen und weitere Teilungsschritte der B-Zellen einzuleiten. Sobald diese abgeschlossen ist und ein komplettes IgM-Molekül auf der Zelloberfläche exprimiert wird, nennt man die Zelle eine unreife B-Zelle. Die unreifen B-Zellen werden in diesem Stadium auf Selbst-Toleranz selektiert und auf ihre Fähigkeit, in den peripheren lymphatischen Geweben zu überleben. Unreife B-Zellen, die nur das IgM-Molekül an ihrer Zelloberfläche exprimieren, werden sofort eliminiert, wenn sie viele multivalente Liganden in ihrer Umgebung binden. Mittels dieses Mechanismus soll schon in den frühesten Stadien der B-Zell-Entwicklung einer Autoimmunität vorgebeugt werden ⁸⁹. B-Zellen, die in der Peripherie überleben, differenzieren sich weiter in reife B-Zellen, die außer IgM auch IgD an ihrer Zelloberfläche tragen. Diese Zellen nennt man auch naive B-Zellen, bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Naive B-Zellen rezirkulieren durch die sekundären Lymphgebiete, wo sie auf fremde Antigene treffen und dadurch aktiviert werden können. Andere Marker der frühen B-Zell-Entwicklung sind Veränderungen in Molekülen der Zelloberfläche (CD45R, CD43 und CD19) ⁹⁰. Hier sei vor allen Dingen CD19 erwähnt, ein Oberflächenprotein, welches auch aktiv in die Signaltransduktionskaskade des B-Zell-Rezeptors eingreift.

1.3.2 “Ménage à trois”

Nach der Entwicklung zur naiven B-Zelle im Knochenmark, wandern die naiven B-Zellen, die an ihrer Oberfläche vor allem IgM und IgD tragen, in die sekundären lymphatischen Organe wie Lymphknoten oder auch Adenoide aus. Hier liegen sie vor allem in den T-Zell-Bereichen, d.h. in den interfollikulären Bereichen der sekundären lymphatischen Gewebe. Die Aktivierung von B-Zellen und ihre Differenzierung zu Antikörper-sezernierende Zellen erfordert gewöhnlich die Hilfe von T-Helferzellen. In dieser T-Zell-abhängigen humoralen Immunantwort bleiben die naiven B-Zellen genau in dieser Region liegen, um dort ihr entsprechendes Antigen zu erkennen ⁹¹. Die naiven B-Zellen, die an ihrer Oberfläche ihren Antigen-spezifischen B-Zell-Rezeptor tragen, nehmen hier das passende Antigen auf und prozessieren es. Der B-Zell-Rezeptor auf B-Lymphozyten erfüllt somit zwei Funktionen: 1. Er überträgt bei Antigenerkennung, wie die Antigenrezeptoren auf T-Zellen, ein Signal in das Zellinnere; 2. Er transportiert die Antigene in das Zellinnere, wo sie abgebaut werden und schließlich als an MHC-II-Moleküle gebundene Peptide an die B-Zell-Oberfläche zurückkehren. Dieses Peptid kann von Antigen-spezifischen T-Helferzellen erkannt werden.

Ferner konnten neue Studien zeigen, dass die Stimulation tonsillärer B-Zellen über ihren B-Zell-Rezeptor zu einer Ausschüttung von Chemokinen führt, die T-Helferzellen anlocken ⁹². Aktivierte CD4⁺ T-Zellen wandern diesen chemotaktischen Gradienten entlang zu den B-Zellen und befähigt sie zur Ausbildung eines direkten Zell-Zell-Kontaktes. Die Antigen-spezifische B-Zelle interagiert demzufolge mit der zuvor aktivierten CD4⁺ T-Helferzelle und erhält von dieser weitere kostimulatorische Signale. Außer den von den T-Zellen sezernierten Zytokinen wie IL-2, IL-4 und IL-5 beinhalten diese “akzessorischen Signale” auch die Kostimulation des CD40 Oberflächenrezeptors auf B-Zellen mit seinem Gegenrezeptor CD40L, der von aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Ein weiteres wichtiges kostimulatorisches Signal ist die CD80/86–CD28 Interaktion ⁹³. Die Kostimulation der naiven B-Zellen mit CD40L wie auch die Interaktion bestimmter Oberflächenmoleküle scheint nicht nur ausschlaggebend für die B-Zell-Proliferation und B-Zell-Differenzierung, sondern auch für den Immunglobulinklassenwechsel zu sein. Tatsächlich haben Experimente gezeigt, dass die Blockierung der Interaktion von CD40-CD40L mit Anti-CD40L die Bildung eines Keimzentrums (GC = germinal centers) und die Entwicklung von B-Gedächtniszellen (memory B-Zellen) hemmt ⁹⁴. Ein wichtiges Beispiel für die Bedeutung der Quervernetzung des CD40-Rezeptors auf B-Zellen ist das Hyper-IgE-Syndrom, bei dem eine Mutation im CD40L-Gen in T-Zellen zu einem schweren IgG und IgA-Mangel führt ⁹⁵.

Zusätzlich zu dem direkten interzellulären B-Zell-T-Zell Kontakt haben andere Studien bewiesen, dass auch DCs einen direkten Einfluss auf die B-Zell-Differenzierung nehmen können ⁹⁶⁻¹⁰⁰. Demzufolge können *in vitro*-generierte DCs unter Mithilfe von IL-2 und CD40L naive B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen ausreifen lassen. Ein möglicher Erklärungsansatz lag hier in der IL-12-Produktion durch CD40L-stimulierte DCs ⁹⁷. Ferner beteiligen sich DCs an der Regulation des Immunglobulinklassenwechsels. So unterstützen DCs einen “Isotype Switch” zu IgA-produzierenden Plasmazellen ⁹⁹. Eine neue Studie zeigt, dass auch PDCs in die Differenzierung von CD40L-aktivierten B-Zellen eingreifen können ⁷⁸. Zusätzlich zu der T-Zell-abhängigen Aktivierung von B-Zellen können also auch DCs, einschließlich der PDC, direkt in die B-Zell-Entwicklung und B-Zell-Differenzierung regulatorisch eingreifen. Besser als der einzelne Dialog zwischen B- und T-Zellen führte diese Erkenntnis zu dem bevorzugten “ménage à trois”-Modell der Antigen-spezifischen Aktivierung naiver B-Zellen. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass zwei neue Liganden auf DCs – “B-lymphocyte-stimulator” (BlyS) und “a proliferation

lymphocyte-stimulator” (BlyS) und “a proliferation inducing ligand” (APRIL) – eine wichtige Rolle in der Entwicklung von reifen B-Zellen und der Antikörperproduktion spielen¹⁰⁰. Als Übersicht der Interaktion von T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen dient **Abbildung 1.2**.

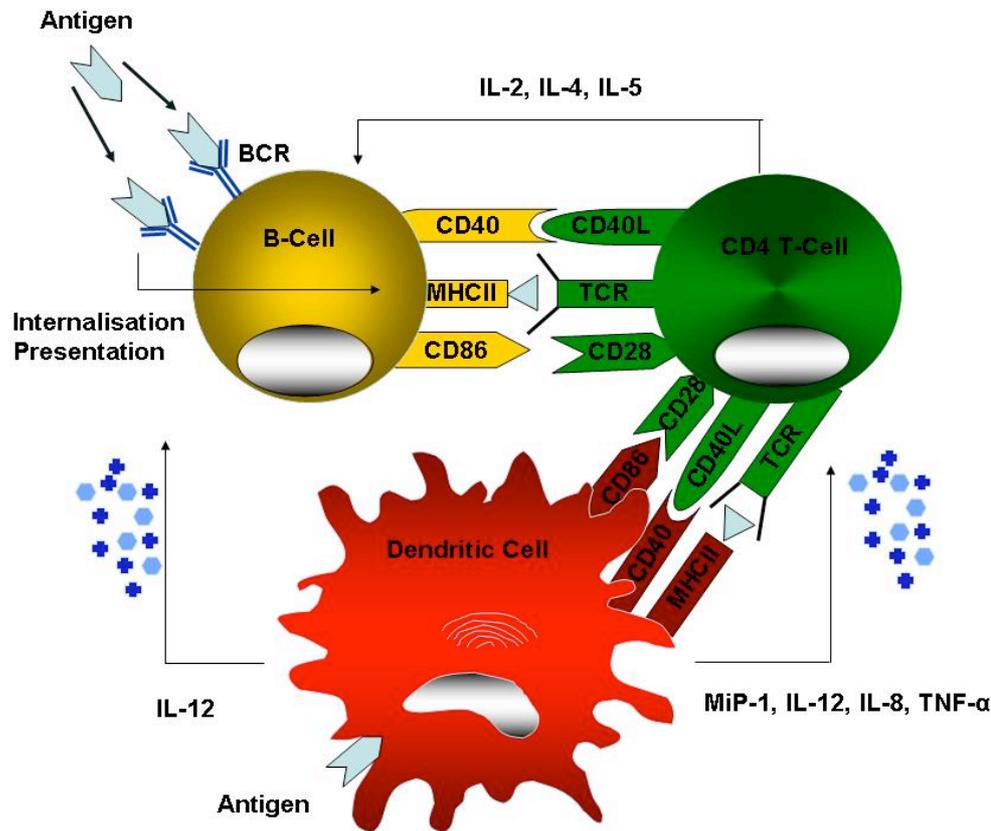


Abbildung 1.2 Ménage à trois

CD40L-aktivierte DCs produzieren Zytokine, welche die Proliferation von CD40L- und antigenstimulierten B-Zellen noch unterstützten. Außerdem sezernieren CD40L-aktivierte DCs IL-12, welches B-Zellen zur Proliferation anregt. Gleichzeitig interagiert die antigen-spezifische B-Zelle mit der zuvor aktivierten CD4⁺ T-Helferzelle und erhält von dieser weitere kostimulatorische Signale. Abgesehen von T-Zell sezernierten Zytokinen wie IL-2, IL-4 und IL-5 beinhalten diese “akzessorischen Signale” auch die Kostimulation des CD40 Oberflächenrezeptors auf B-Zellen mit seinem Gegenrezeptor CD40L. Im Zusammenspiel mit T-Zelle und DC werden die CD40L-aktivierten naiven B-Zellen angeregt, sich in Antikörper-produzierende Zellen zu entwickeln. (Adaptiert nach Van Kempen et al.; *The immune response in adenoids and tonsils; International Archives of Allergy and Immunology* 2000; 122: p. 8-19)

1.3.3 Die Bildung des folliculären Keimzentrums

Nach den oben beschriebenen Interaktionen in den T-Zell-Bereichen des lymphatischen Gewebes proliferieren die antigenerfahrenen B-Zellen an Ort und Stelle und wandern schließlich entlang eines chemotaktischen Gradienten entweder zum Primärfollikel und initiieren dort die Bildung eines folliculären Keimzentrums oder die aktivierten B-Zellen bleiben extrafollikulär¹⁰¹. Die primären Follikel enthalten ruhende B-Zellen, die um ein dichtes Netzwerk von Zellfortsätzen angeordnet sind, die von einem spezialisierten Zelltyp, den folliculären dendritischen Zellen (FDCs), ausgehen. Auch die T-Zellen proliferieren und wandern zusammen mit den B-Zellen in die primären Follikel. In den extrafollikulären Arealen vollziehen die B-Zellen eine klonale Expansion und differenzieren zu kurzlebigen (2-3 Tage) Antikörper-produzierenden Plasmazellen, die allerdings eine niedrige Antigenaffinität aufweisen¹⁰².

Die vorwiegend produzierten IgM-Antikörper binden zirkulierendes Antigen und führen zur Bildung löslicher Immunkomplexe. Während der T-Zell-abhängigen Antigenantwort entwickeln sich die Keimzentren in den Primärfollikeln. Mit der Bildung eines Keimzentrums im Primärfollikel wird dieser zum Sekundärfollikel. In den Keimzentren herrscht ein spezielles Mikromilieu, das die Affinitätsreifung, d.h. die wachsende Affinität der Antikörper für das Antigen, von B-Zellen beschleunigt. Diese Affinitätsreifung entwickelt sich aus einer somatischen Hypermutation der Immunglobulingene in Verbindung mit einer Selektion von B-Zellen mit hoch-affinen Oberflächenimmunglobulinen (B-Zell-Rezeptoren) und der Reifung zur B-Gedächtniszelle oder Plasmazelle.

Als somatische Hypermutation beschreibt man einen Prozess, bei dem in die variablen Regionen ungeordneter Gene für die schweren und leichten Ketten in großem Umfang Punktmutationen eingefügt werden, so dass mutierte Immunglobuline an der Oberfläche der B-Zellen erscheinen. Einige der mutierten Immunglobuline binden besser an Antigene als die ursprünglichen, so dass die B-Zellen, die diese Antikörper exprimieren, selektiert werden und zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen ausreifen. Die unterschiedlichen Stufen der B-Zell-Reifung in diesen Keimzentren wurden von Liu et al. in sieben phänotypisch verschiedene B-Zell-Suptypen eingeteilt¹⁰³. Die B-Zell-Population des Primärfollikels hat vorwiegend einen naiven Phänotyp (IgM⁺, IgD⁺ und CD38⁻). Wenn die aktivierten B-Zellen erst einmal intrafollikulär sind, proliferieren sie für unge-

fähr 3 Tage und werden zu Zentroblasten, die vor allem hoch-positiv für den Proliferationsmarker Ki-67 sind. Diese intensive CD40/CD40L-induzierte Proliferation von aktivierten GC-B-Zellen scheint desweiteren von einem speziellen DC-Subtyp, genannt Keimzentrum (GC)-DC, gefördert zu werden¹⁰⁴. Als Konsequenz dieses reichlich Platz verbrauchenden Vorgangs werden die ruhenden B-Lymphozyten im Inneren des Follikels nach außen verdrängt und bilden so einen folliculären Mantel aus (die so genannte Mantelzone). Ungefähr 4 Tage nach der Antigenstimulation ist das Keimzentrum voll entwickelt und besteht aus einer inneren dunklen und einer äußeren hellen Zone⁹¹.

1.3.4 Vom Zentrozyten zur Plasmazelle

In der inneren dunklen Zone vollziehen Zentroblasten somatische Hypermutationen in ihren unterschiedlichen Immunglobulingenen, was zur Entstehung von Zentrozyten führt¹⁰⁵. Diese Zentrozyten, einschließlich einiger autoreaktiver Klone, besitzen eine Vielzahl an unterschiedlich affinen und spezifischen B-Zell-Rezeptoren. Um zu verhindern, dass B-Zellen mit einer niedrigen Affinität oder gar autoreaktive Mutanten in den B-Gedächtniszell-Pool miteinbezogen werden, findet ein positiver Selektionsprozess statt, der in den basalen Bereichen des Keimzentrums initiiert wird. Der genaue Ablauf dieses Selektionsprozesses ist in verschiedenen Übersichtsartikeln beschrieben^{105, 106}. So werden in diesem Prozess nur die Zentrozyten mit der höchsten Spezifität ihres BCR für das Antigen selektioniert. Mutanten, die nur eine niedrige Affinität für das entsprechende Antigen aufweisen, sterben durch Apoptose¹⁰⁷. Eine weitere Konsequenz dieses Selektionsprozesses ist die Induktion von T-Zell-Zytokinen, z.B. IL-4 und IL-10. Diese Zytokine repräsentieren zusammen mit der CD40L-Stimulation die Schlüsselemente für die Proliferation und den Klassenwechsel von hoch-affinen Zentrozyten¹⁰⁸.

Tatsächlich findet der Immunglobulinklassenwechsel vor allem in der hellen, apikalen Zone in der Nähe von T-Zellen statt¹⁰⁹. Während dieses Prozesses wechseln die B-Zellen ihre Antikörperklasse von IgM zu IgG und anderen Isotypen und vollziehen somit den "Isotype Switch". Dabei wird die DNA so umgelagert, dass die variable Region in die Nähe des 5' Endes verschiedener Gene der schweren Kette gelangt. So wird ein produktiv umgelagertes Gen der variablen Region mit einem anderen Isotyp als der μ - oder δ -Kette gekoppelt. Dies geschieht ohne zu einer Veränderung der Antigenspezifität

zu führen. Die dadurch hoch-affinen, “geswitchten” Zentrozyten differenzieren in entweder B-Gedächtniszellen oder Plasmablasten (Plasmazellvorläufer) aus. In einem letzten Schritt emigrieren die hypermutierten und hoch-affinen B-Gedächtniszellen, wahrscheinlich durch Chemokine gesteuert, von den Keimzentren in die extrafollikulären Kompartimente ¹¹⁰. Die Plasmazellvorläufer verlassen nun ebenfalls das GC und setzen ihre Entwicklung mit einigen Zellteilungen extrafollikulär fort, um dann hoch-affine Antikörper-produzierenden Plasmazellen zu werden ¹¹¹.

1.3.5 Die wichtigste Entscheidung: memory B-Zelle oder Plasmazelle

Welche Mechanismen zur Bildung von B-Gedächtniszellen und Plasmazellen führen, sind bis heute noch nicht ausreichend erforscht. Eine Studie, die sich mit der Reifung von hoch-affinen Antikörpern aus Plasmazellen und B-Gedächtniszellen beschäftigt hat, stellte fest, dass die Expression von hoch-affinen Antikörpern eher mit der Bildung von Plasmazellen als mit der Bildung von B-Gedächtniszellen einhergeht ¹¹². In anderen Studien konnte belegt werden, dass eine Stimulation mit CD40L einen “memory” B-Zell-Phänotyp (IgD⁻CD38⁻CD27⁺) bevorzugt, während in der Anwesenheit von IL-2 und IL-10 und der Abwesenheit von CD40L eine terminale Plasmazelldifferenzierung (CD38⁺ und CD20⁻) stattfindet ^{110, 113}. IL-10 unterdrückt die Expansion der B-Gedächtniszellen, während IL-4 zu einer Förderung dieses Prozesses beiträgt ¹¹⁴. Obwohl IL-6 noch viele andere Aufgabenbereiche hat, wird es auch für die Bildung von Plasmablasten und Antikörper-sezernierenden Plasmazellen benötigt ¹¹⁵. Die Entwicklung und das Überleben von Plasmazellen ist jedoch auch abhängig von spezifischen Subtypen dendritischer Zellen ¹¹⁶. Als Antwort auf eine zweite Stimulation mit Antigen kommt es zu einer rapiden und massiven Expansion von B-Gedächtniszellen, welche im Vergleich mit der Primärantwort zu einer zehnfachen Steigerung von Plasmazellen führt ¹¹⁷. Die Biologie der B-Gedächtniszellen ist bis heute trotzdem nicht gut verstanden, zumal wir wissen, dass sie sogar in Abwesenheit von Antigen langlebig sind ¹¹⁸.

1.3.6 Die humane B-Zelle als zweite TLR9 tragende Zelle

Die TLR9-Expression von B-Zellen in einen funktionellen Zusammenhang mit CpG-Stimulation und B-Zell-Rezeptor-Aktivierung zu bringen, ist Gegenstand vorliegender

Arbeit. Ähnlich wie andere APCs exprimieren auch humane B-Zellen TLRs¹¹⁹. Die Familie der TLRs verhilft dazu, unter einer großen Vielfalt von PAMPs unterscheiden zu können. Humane B-Zellen exprimieren nur limitiert TLRs einschließlich TLR9^{7, 120}. Der natürliche Ligand für TLR9 sind CpG-Motive in mikrobieller DNA⁵. Die Aktivierung von murinen und humanen B-Zellen durch CpG-Motive via TLR9 ist schon gut charakterisiert¹²¹⁻¹²³. Die einzige andere Zelle, die im humanen System TLR9 exprimiert, ist die schon ausführlich dargestellte PDC. In einer neueren Studie konnte die Arbeitsgruppe um Lanzavecchia ein detailliertes TLR-Expressionsmuster der B-Zell-Subpopulationen skizzieren¹²⁰. So war die Expression von TLR9 in unstimulierten naiven B-Zellen sehr gering, während sich in unstimulierten memory B-Zellen eine sehr hohe Expression von TLR9 nachweisen ließ.

1.4 CpG-Oligonukleotide als Adjuvantien in der Immuntherapie

1.4.1 Entdeckung der CpG-DNA

Mehr als 100 Jahre sind vergangen, seit der New Yorker Chirurg William Coley versuchte, mit bakteriellen Lysaten Patienten mit inoperablen Sarkomen zu behandeln. Die Injektion von Lysaten aus *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* in Tumoren führte bei einem Teil der Tumoren zu einer vorübergehenden Rückbildung^{124, 125}. Ein Problem war allerdings, dass die Standardisierung von bakteriellen Lysaten um die Jahrhundertwende noch nicht möglich war und die einzelnen Komponenten des Immunsystems noch nicht identifiziert waren. 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. Fast 100 Jahre später erwachte erneutes Interesse an der Immuntherapie maligner Neoplasien mit bakteriellen Lysaten. Die intravesikale Applikation von BCG hatte sich seit Einführung 1976 durch Morales zu einer Standardtherapie früher Tumorstadien des Blasenkarzinoms entwickelt¹²⁶, wobei jedoch der Wirkmechanismus unbekannt war. Tokunaga entdeckte 1984, dass der antitumorale und immunstimulatorische Effekt des Lysates von Tuberkelbazillen durch bakterielle DNA hervorgerufen wird¹²⁷. Yamamoto zeigte 1992, dass die DNA von Bakterien, nicht aber die von Wirbeltieren, immunstimulatorische Aktivität aufweist wie z.B. die Induzierung einer NK-Zell-Aktivierung und die Produktion von Typ I In-

terferonen¹²⁸. Diese Beobachtungen konnten somit einen Erklärungsansatz bieten, warum das Immunsystem des Säugetiers zwischen eigener und bakterieller DNA zu unterscheiden vermag: Cytosin-Guanosin-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. Bis zu 80% 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. Diese strukturelle Differenz zwischen bakterieller und Vertebraten-DNA suggeriert, dass die Erkennung von unmethylierten CpG-Motiven für die immunmodulatorischen Fähigkeiten von ODN verantwortlich ist und nicht, wie von anderen Arbeitsgruppen postuliert, auf Palindrome oder höhere Sekundärstrukturen zurückzuführen ist^{129, 130}. Arthur Krieg konnte diese These untermauern, indem er zeigte, dass ODN, die ein methyliertes CpG-Motiv enthielten, ihre immunstimulatorischen Fähigkeiten völlig verloren¹³¹.

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 entdeckte bei Versuchen mit Antisense-ODN, dass einige dieser Oligonukleotide die Proliferation von B-Zellen induzierten. Synthetische DNA ist wie bakterielle DNA am Cytosin nicht methyliert. Er bewies, dass unmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide in einem bestimmten Basenkontext, so genannte CpG-Motive (p steht für die Phosphatbindung), verantwortlich für die immunstimulatorischen Effekte von bakterieller und synthetischer DNA sind¹³². Oligonukleotide, die diese CpG-Motive enthalten, werden als CpG-ODN bezeichnet und sind das synthetische Pendant der bakteriellen DNA. Diese Beobachtungen formten die Hypothese, dass sich die "immunologische Detektion" von CpG-DNA im Laufe der Evolution zu einem Verteidigungsmechanismus entwickelt hat, der es Vertebraten erlaubt, "fremd" von "selbst" zu unterscheiden. Die Entdeckung des Gefahrensignals CpG-DNA lieferte zudem eine schlüssige Erklärung für die bis dato rätselhafte unspezifische Wirkung von DNA-Vakzinen sowie den immunstimulatorischen Effekt mancher ODN im Rahmen von Antisense-Experimenten¹³³.

1.4.2 TLR9 als Erkennungsmechanismus für CpG-Motive

Seit Tokunagas Entdeckung der immunstimulatorischen Wirkung von bakterieller DNA und insbesondere seit Arthur Kriegs detaillierter Charakterisierung der hierzu notwendigen CpG-Motive wurden viele Spekulationen angestellt, über welchen Erkennungsmechanismus dieser Effekt vermittelt wird. Obwohl die meisten Zellen CpG-DNA an ihrer Oberfläche binden^{132, 134}, stellte sich bald heraus, dass dies sequenz-unabhängig stattfindet. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass CpG-DNA nur nach intrazellulärer Aufnahme in endosomale Kompartimente und nach folgender Azidifizierung seine Wirkung entfalten kann¹³⁵. In dieser Studie konnten Chloroquin und Bafilomycin A, beides potente Reagenzien zur Inhibition der endosomalen Azidifizierung, die immunstimulatorische Fähigkeit von CpG-DNA komplett blockieren. Die Suche nach dem genauen Erkennungsmechanismus blieb jedoch weiterhin lange erfolglos.

Erste Hinweise, die zu der Identifizierung des mutmaßlichen "CpG-Rezeptors" führten, kamen schließlich von Untersuchungen der durch CpG-Stimulation implementierten Signaltransduktionskaskade. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von B-Zellen durch CpG-DNA eine Aktivierung von p38 und JNK (JNK = *C-Jun-NH2-Terminal-Kinase*), beides so genannte MAP-Kinasen (MAP = *Mitogen-Aktiviertes-Protein-Kinase*), bewirkt. Die über p38 vermittelte Signaltransduktionskaskade scheint hierbei ein essentieller Teil der CpG-induzierten B-Zell-Aktivierung zu sein¹³⁶. Die durch CpG-Stimulation von Makrophagen, murinen und humanen B-Zellen induzierte Gen-Expression zeigte auch eine deutliche Aktivitätszunahme von NF-κB (NF = Nuklear Faktor)^{123, 137, 138}. Wenig später gelang es schließlich nachzuweisen, dass CpG-DNA über MyD88 (MyD = Myeloid Differentiation Faktor) und TRAF6 (TRAF = TNF-Rezeptor assoziierter Faktor) signalisiert, so dass ein Rezeptor aus der Toll-Familie als mutmaßliche "CpG-Erkennungsstruktur" immer wahrscheinlicher wurde¹³⁹. Hemmi und Mitarbeiter identifizierten letztlich anhand der Analyse von verschiedenen TLR-Knock-out-Mäusen die Expression von TLR9 als notwendige Voraussetzung für die Erkennung von CpG-DNA⁵. Diese Beobachtung konnten durch die Arbeitsgruppen um Bauer für das humane System bestätigt werden. Bauer und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine Expression von TLR9 nicht nur notwendig für die Erkennung von CpG-Motiven ist, sondern es auch ausreicht durch eine Transfektion von TLR9 in Zellen, die normalerweise nicht auf CpG-DNA reagieren, eine CpG-Antwort zu induzieren⁶.

1.4.3 Wirkung auf das Immunsystem

Zurzeit stellt CpG-DNA im Vergleich mit anderen mikrobiellen Molekülen eines der potentesten Immunmodulatoren dar. So wird durch systemische CpG-Applikation sowohl ein starkes systemisches T_H1-Zytokinmilieu (hohe IFN- γ und IL-12-Spiegel) geschaffen als auch die Entwicklung von zytotoxischen T-Zellen gefördert. Bedingt durch dieses Zytokinmilieu zeigte sich insbesondere in Infektionsmodellen nicht nur in der prophylaktischen, sondern auch in der therapeutischen Applikation von CpG-DNA eine starke antimikrobielle Wirkung¹⁴⁰. So schützt die einmalige Gabe von CpG-Motivhaltigen ODNs Mäuse vor der letalen Infektionsdosis mit bakteriellen intrazellulären Erregern wie Leishmanien, Listerien oder Parasiten oder gar Prionen vor allem durch IFN- γ und IL-12-abhängige Mechanismen¹⁴⁰. Der Hauptmechanismus dieser Effekte ließ sich auf die unspezifische Aktivierung der angeborenen Immunität zurückführen. Jedoch erwies sich CpG-DNA auch in der Induktion einer adaptiven Immunität sowohl in der prophylaktischen als auch in der therapeutischen Anwendung als effektiv. So haben mittlerweile zahlreiche Studien gezeigt, dass CpG-DNA ein potentes Adjuvans darstellt um humorale und zelluläre Antigen-spezifische Immunantworten hervorzurufen (Modell-Protein und Peptid-Antigene^{141, 142}, bakterielle und virale Proteine¹⁴³, Tumorantigene¹⁴⁴ und Polysaccharide¹⁴⁵). Im Folgenden sollen kurz die bisher bekannten Effekte auf verschiedene Zellen des Immunsystems näher erläutert werden:

1.4.4 B-Zellen

Die Wirkung von CpG-ODN auf humane B-Zellen ist Gegenstand dieser Arbeit. Hier eine Übersicht der bis heute bekannten Daten:

Humane B-Zellen exprimieren TLR9 und sind somit sensitiv gegenüber CpG-Stimulation^{7, 120}. Optimale CpG-ODN-Sequenzen stellen folglich starke Mitogene für B-Zellen fast aller Vertebraten dar^{123, 132}. Innerhalb weniger Stunden kommt es zu einer Produktion von IL-10 sowie IL-6, welches unter anderem für die Entwicklung Antikörper-sezernierender Plasmazellen notwendig ist¹⁰⁸. Neben der Induktion von Zytokinen und Immunglobulinen wird durch CpG-DNA-Stimulation auch eine vermehrte Expression von Oberflächenrezeptoren (Fc γ , MHC II, CD40, CD54) und kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) erreicht^{123, 131, 143}.

1.4.4 Dendritische Zellen

Die verschiedenen Subtypen muriner und humaner dendritischer Zellen sind auf Grund ihrer differentiellen Ausstattung mit TLRs in der Lage, auf diverse Pathogene eine entsprechende Immunantwort auszulösen. Wie bereits dargestellt, besitzen unter den DC-Vorläufern nur PDCs hohe Mengen an TLR9^{49, 50, 146}. Schon in früheren Untersuchungen stellte sich heraus, dass von den humanen DC-Subtypen nur die lineage⁻, CD4⁺ und MHC II⁺ DCs direkt durch CpG-DNA aktiviert werden können¹⁴⁷. Diese DC-Fraktion stellte sich als identisch mit der oben beschriebenen PDC des peripheren Blutes heraus^{44,65}. Die direkte Aktivierung der PDCs durch CpG-DNA führt zu einer gesteigerten Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle (MHC II, ICAM-1, CD40, CD54, CD80, CD86), zu erhöhter Zytokinsekretion (TNF- α , IL-6), Chemokinproduktion (IL-8, IP-10, GM-CSF) und auch zur Reifung zu CD83⁺ DCs, welche zu einer verstärkten Aktivierung von allogeenen T-Zellen führt^{49, 50, 147}. Nach Stimulation mit CpG-DNA exprimieren PDCs den Chemokinrezeptor CCR7. Die Expression von CCR7 ist vielleicht ein Grund dafür, dass PDCs zusammen mit naiven T-Zellen und memory T-Zellen in den T-Zell-Arealen sekundärer lymphatischer Organe vorkommen¹⁴⁸. In Kombination mit CD40L induziert CpG-DNA hohe Mengen an bioaktivem IL-12p70 in PDCs. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bestimmte CpG-ODNs so große Mengen IFN Typ I in PDCs induziert, wie sie sonst nur bei Virusinfektionen vorkommen⁷². Einer Übersicht der Wirkung von CpG-ODN auf das Immunsystem einschließlich der NK- und T-Zell-Aktivierung dient **Abbildung 1.3**.

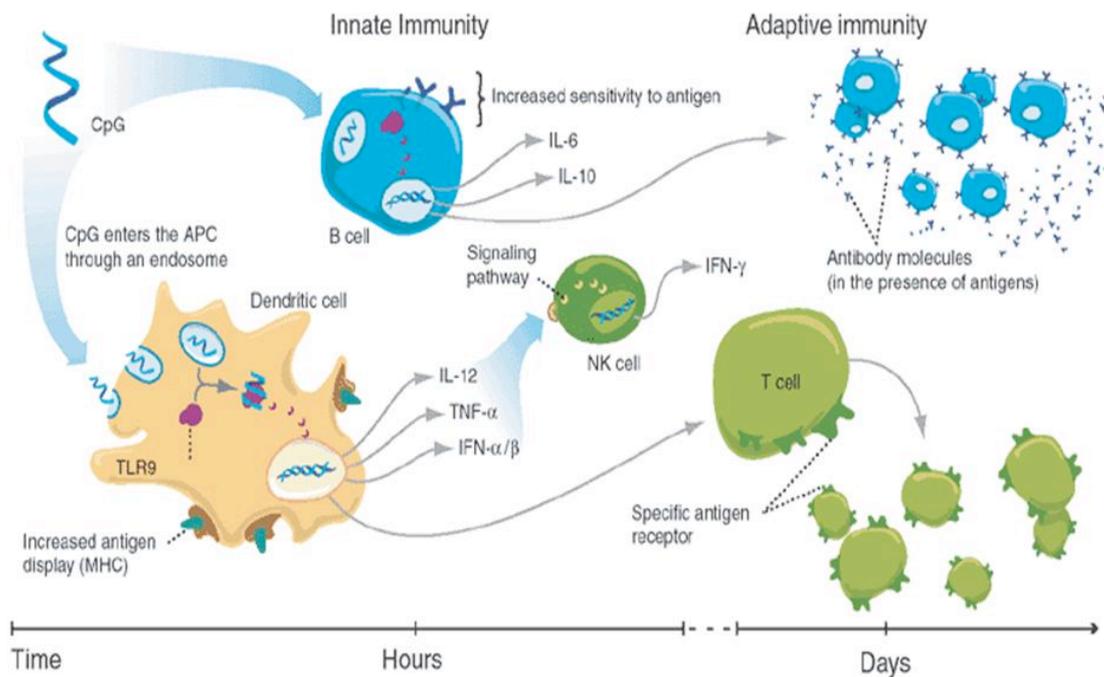


Abbildung 1.3 CpG und sein Einfluss auf das Immunsystem

DNA, welche eine oder mehrere CpG-Motive beinhaltet, wird von den meisten Immunzellen über Endozytose aufgenommen, aktiviert direkt aber nur Zellen, welche den TLR9-Rezeptor exprimieren (B-Zellen und PDCs im Menschen). Diese Zellen können durch die Sekretion von IFN- α , IFN- β , IL-12, IP-10 und andere T_H1 -fördernde Zytokine und Chemokine ein T_H1 -ähnliches Zytokinmilieu schaffen. NK-Zellen werden indirekt aktiviert, welches zu einer Zunahme der IFN- γ -Sekretion sowie einer Zunahme der lytischen Aktivität führt. Zusätzlich reagieren B-Zellen bei gleichzeitiger Kostimulation des B-Zell-Rezeptors mit vermehrter Antikörperproduktion und beide, B-Zellen wie auch PDCs, exprimieren vermehrt kostimulatorische Oberflächenmoleküle. APC, Antigen-präsentierende Zelle; MHC, Major Histocompatibility Complex; (Krieg, A; CpG-motifs: the active ingredient in bacterial extracts?; *Nature Medicine* 2003; 9(7): p. 831-835).

1.4.6 Differenzierung zweier verschiedener CpG-Klassen

Neben Speziesunterschieden in der Erkennung von CpG-Motiven, zeigte sich, dass im humanen System nicht nur ein Unterschied in der Quantität der CpG-vermittelten Immunantwort zu beobachten war, sondern auch ein qualitativer Unterschied in der induzierten Immunantwort. Auf Grund dieser Beobachtungen wurde die Existenz von zwei verschiedenen Klassen von CpG-ODNs postuliert, die CpG-A und CpG-B¹³¹ genannt wurden. Die Einteilung in diese Klassen folgte primär den Beobachtungen unterschiedlicher biologischer Wirkprofile der beiden TLR9-exprimierenden Zellen, B-Zelle und PDC. Die Prototypsequenz von CpG-A ist ODN 2216 und induziert große Mengen IFN- α in PDCs, welches zu einer starken Aktivierung und IFN- γ -Produktion von NK- und $\gamma\delta$ -T-Zellen führt^{72, 149}. ODN 2006 ist der Prototyp des CpG-B-ODN, welches einen starken Stimulus für B-Zellen darstellt^{123, 132}. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass CpG-B zu einer polyklonalen Aktivierung von B-Gedächtniszellen führt¹⁵⁰. In anderen Studien konnte demonstriert werden, dass CpG-B zwar nur geringe Mengen IFN- α/β in PDCs induziert, aber dafür zu einem verbesserten Überleben, einer gesteigerten Reifung und Aktivierung von PDCs führt⁷². Eine ähnliche Einteilung wurde von der Arbeitsgruppe um Klinman vorgeschlagen, wobei CpG-A mit dem so genannten D-Typ ODN und CpG-B mit dem K-Typ ODN korrespondiert. Diese Einteilung beruht jedoch auf der IFN- γ -Produktion von NK-Zellen, der IL-6-Produktion von Monozyten und der IgM-Synthese von B-Zellen^{151, 152}.

Ferner werden zur Einteilung nach biologischen Wirkprofilen strukturelle Eigenschaften herangezogen, die sich auf ODN-Rückgrat, CpG-Motiv als auch Vorhandensein von Poly-G-Motiven beziehen. Eine Zusammenfassung der Charakteristika der CpG-ODN-Klasseneinteilung zeigt Tabelle 1.2. Erst kürzlich konnte jedoch eine dritte Klasse von CpG-Motiv enthaltenden Sequenzen identifiziert werden, die eine direkte Aktivierung von humanen B-Zellen ermöglicht und gleichzeitig IFN- α in PDCs induziert¹⁵³. Die weitere Charakterisierung dieser neuen Gruppe von CpG-ODN ist Gegenstand vorliegender Arbeit.

	CpG-A	CpG-B	CpG-C
Primäre Zielzelle	PDC	B-Zelle	PDC und B-Zelle
Prototyp	ODN 2216	ODN 2006	M352
Struktur	Phosphodiester/ Phosphorothioat Chimär-Rückgrat Poly-G-Enden zentrales Palindrom mit CG	Vollständiges Phosphorothioat – Rückgrat enthält das optimale „humane CpG Mo- tiv“ GTCGTT	Vollständiges Phosphorothioat – Rückgrat zentrales Palindrom mit CG enthält das optimale „humane CpG Mo- tiv“ GTCGTT
Funktion	Schwache Aktivie- rung von B-Zellen, induziert große Mengen IFN Typ I in PDCs	Starke Aktivierung von B-Zellen, induziert geringe Mengen IFN Typ I in PDCs	Starke Aktivierung von B-Zellen (CD86, IL-6, TNF- α) und PDCs (große Mengen IFN Typ I)

Tabelle 1.2 Die Charakteristika der humanen CpG-Klassen

1.5 Therapeutischer Einsatz synthetischer Oligonukleotide

In Anbetracht des oben Aufgeführten kann man also sagen, dass CpG-Oligonukleotide aus mehreren Gründen ein vielversprechendes Immunstimulans für den klinischen Einsatz darstellen:

1. CpG-ODN führen im Gegensatz zu einzelnen Zytokinen durch ihren Wirkungsmechanismus zu einer koordinierten Immunreaktion, die der natürlichen Situation näher kommt.
2. Die selektive Aktivierung professioneller APCs und die damit verbundene Förderung einer Antikörperproduktion und zellulären Immunantwort machen CpG-ODN zu einem geeigneten Adjuvans sowohl bei prophylaktischen als auch bei therapeutischen Impfungen.
3. Die Induktion einer T_{H1} -Antwort mit Produktion von IFN- γ und IL-12 wehrt Infektionen mit intrazellulären Erregern ab.
4. Die CpG-vermittelte Stimulation des angeborenen Immunsystems und der T_{H1} -Immunität unterstützt die immunologische Abwehr von Tumorzellen durch die erhöhte IFN- γ -Sekretion zytotoxischer T-Zellen und Antikörperproduktion gegen spezifische Proteine und Peptide unabhängig von der T-Zell-Hilfe. Im Folgenden sollen die bisher bekannten therapeutischen Einsätze von CpG-ODN erläutert werden:

1.5.1 CpG-DNA als Monotherapie in der Immuntherapie von Tumoren

Schon seit längerem gibt es Hinweise darauf, dass die unspezifische Aktivierung des Immunsystems durch Pathogene zur Bekämpfung von Tumoren beitragen kann. Eine protektive Immunüberwachung, vermittelt insbesondere durch IFN- γ und aktivierte Lymphozyten, kann das Wachstum maligner Tumoren verhindern¹⁵⁴. Durch Aktivierung von Lymphozyten und Induktion von IFN- γ könnte CpG-DNA zu einer Aktivierung der angeborenen Immunität beitragen und so die endogenen Mechanismen der Immunüberwachung fördern. Diese Hypothese wurde in mehreren Mausversuchen bestätigt, in denen eine prophylaktische CpG-ODN-Gabe sowohl spontane¹⁵⁵ als auch induzierte Neoplasien¹⁵⁶ verminderte oder sogar verhindern konnte. Aber auch zahlreiche Studien, in denen eine therapeutische CpG-Applikation nach Tumorbefall verschiedener Stadien durchgeführt wurde, konnten eine deutliche Regression des Tumorwachstums, wenn nicht sogar eine komplette Remission zeigen¹⁵⁷. In manchen Modellen ließ sich sogar nachweisen, dass ein erneuter Tumorbefall nach erfolgreicher Erradikation eines induzierten Tumors durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses verhindert werden konnte^{158, 159}. Eine entscheidende Rolle in der möglichen Ausbildung einer adaptiven Immunität scheinen hierbei einerseits die Art des Tumors und andererseits die Applikationsform und Art der CpG-DNA zu spielen¹⁶⁰. Die Monotherapie maligner Tumoren mit CpG-DNA befindet sich zurzeit in Phase I/ II Studien der klinischen Erprobung.

1.5.2 CpG-DNA als Mechanismus der ADCC

Zurzeit werden mehr als 70 humanisierte monoklonale Antikörper gegen Tumorantigene in klinischen Studien untersucht, wobei Rituximab, Herceptin und auch Alemtuzumab schon für den klinischen Gebrauch zugelassen sind. Ein Haupteffekt monoklonaler Antikörper gegen Tumorantigene wird auf die so genannte antikörper-vermittelte zellgebundene Zytotoxizität (ADCC) zurückgeführt. Hierbei wird eine Tumorzelle durch einen spezifischen Antikörper gebunden, welcher wiederum durch seinen Fc-Teil von einer Fc-Rezeptor-tragenden Zelle, meist NK-Zellen und Neutrophile, erkannt wird. Die Fc-Rezeptor-tragende Zelle wird durch den Bindungsprozess so aktiviert, dass es zu einer Lyse der antikörpergebundenen Zielzelle kommt. Im Mausversuch konnte nachgewiesen werden, dass dieser Prozess der ADCC durch CpG-Applikation stark geför-

dert wird und somit in Therapieansätzen mit monoklonalen Antikörpern einen deutlichen Synergismus zeigte¹⁶¹. Neben einer Maximierung der ADCC wird bei manchen Neoplasien auch zusätzlich eine verstärkte Expression des Zielantigens durch CpG-Applikation beobachtet. So wird z.B. auf primären malignen B-Zellen verschiedener Histologien eine Expressionssteigerung von CD20 erreicht, dem Zielantigen von Rituximab^{162, 163}. Derzeit laufen mehrere Phase I/ II-Studien, die die Kombinationstherapie von CpG-ODNs und monoklonalen Antikörpern untersuchen.

1.5.3 CpG-DNA als Adjuvans einer Tumorstoffimpfung

Die Erkenntnis, dass CpG-DNA möglicherweise ein potentes Adjuvans in einer Antigen-spezifischen Immuntherapie von Tumoren darstellt, führte zu zahlreichen Studien, die gezielt CpG-DNA als Adjuvans einer Tumorstoffimpfung im Maussystem untersuchten. Hierbei erwies sich die Anwendung von CpG-DNA sowohl in prophylaktischen als auch in therapeutischen Impfstrategien als wirksames Adjuvans bei der Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort. CpG-DNA wurde als Adjuvans mit unterschiedlicher Formulierung des Antigens (Tumorpeptide, Tumorproteine und ganze Tumorzellen¹⁶⁴ in sowohl *in vivo*^{159, 165} als auch *ex vivo*¹⁶⁴ Ansätzen erfolgreich getestet. Die durch CpG-DNA aktivierten dendritischen Zellen schaffen in sekundären lymphoiden Organen eine T_H1 -gerichtete Chemokin- und Zytokinumgebung, die eine effektive Cross-Präsentation von Antigenen fördert und somit eine starke Antwort IFN- γ -produzierender zytotoxischer T-Zellen induziert. Im Rahmen von DNA-Vakzinierungsstudien hat sich der Einsatz von CpG-Motiven als besonders vorteilhaft erwiesen, da hier CpG-DNA die fehlende CD4-T-Zell-Hilfe für ein effektives CTL-Priming ersetzen kann. Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass der Einsatz von CpG-ODN als Adjuvans bei Vakzinierung stärkere T_H1 -Antworten hervorruft als der klassische Goldstandard komplettes Freundesches Adjuvans¹⁶⁶.

1.5.4 CpG-DNA und Allergie

Eine weitere immuntherapeutische Anwendung von CpG-DNA findet sich im Fachgebiet der Allergologie¹⁶⁷. So kann CpG-DNA, sei es alleine oder in Form einer Allergiestoffimpfung appliziert, in Mausmodellen sowohl die Induktion von allergischen

Immunantworten verhindern als auch schon bestehende allergische Tendenzen umkehren¹⁶⁷. Bis jetzt war angenommen worden, dass der Mechanismus dabei in einer immunologischen Umkehrung einer allergischen T_H-2 Antwort zu einer T_H1-Antwort besteht. Neuere Studien schlagen jedoch komplexere Mechanismen vor, die möglicherweise regulatorische T-Zellen miteinbeziehen¹⁶⁸.

1.6 Fragestellung

Dendritische Zellen, T-Zellen und B-Zellen sind die Hauptakteure des menschlichen Immunsystems. In diesem System kontrollieren die T-Zellen einen großen Teil der Aktivität humaner B-Zellen. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit basierte der Wissensstand darauf, dass eine Aktivierung von B-Zellen durch Proteinantigene nicht nur die Bindung an den B-Zell-Rezeptor erfordert, sondern auch eine gleichzeitige Wechselwirkung mit Antigen-spezifischen T-Helferzellen. Darüber hinaus spielt die Sekretion verschiedener Zytokine von T-Zellen eine entscheidende Rolle. Anschließend differenzieren die klonal expandierenden Nachkommen der naiven B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder memory B-Zellen. Erst neuere Erkenntnisse in der B-Zellbiologie weisen darauf hin, dass die Aktivität spezifischer Subtypen von B-Zellen auch ohne T-Zell-Hilfe reguliert werden kann. Ähnlich wie andere APCs exprimieren nämlich auch humane B-Zellen Toll-Like-Rezeptoren (TLRs).

Die Familie der TLRs stellt ein Mittel dazu dar, unter einer großen Vielfalt von mikrobiellen Molekülen, den "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs), unterscheiden zu können. Humane B-Zellen exprimieren nur limitiert TLRs einschließlich TLR9. Natürliche Liganden für TLR9 sind CpG-Motive in mikrobieller DNA. Bakterielle DNA stellt für das angeborene Immunsystem ein potentes Gefahrensignal dar und ist in der Lage, eine effektive adaptive Immunantwort gegen ein gleichzeitig wahrgenommenes Antigen auszulösen. Die CpG-Motive innerhalb bakterieller DNA sind die Grundlage für die Erkennung durch das Immunsystem. In Form synthetischer, CpG-haltiger Oligonukleotide lässt sich die immunstimulatorische Wirkung bakterieller DNA nachahmen. Neben der B-Zelle exprimiert im humanen System nur die plasmazytoide dendritische Zelle (PDC) TLR9. Diese Zelle ist charakterisiert durch die hohe Produktion von Typ I Interferonen (IFN- α und IFN- β) als Antwort auf eine Virusinfektion. CpG-

DNA stellt ein einzigartiges mikrobielles Molekül dar, welches zu einer starken Aktivierung und Reifung der PDCs führt. Es wurden bisher unterschiedliche Klassen an CpG-Oligonukleotiden identifiziert: CpG-A (Prototyp ODN 2216) induziert hohe Mengen an IFN- α in PDCs, CpG-B (Prototyp ODN 2006) führt vorwiegend zur Aktivierung von B-Zellen. Erst kürzlich wurde jedoch ein neues CpG-ODN entwickelt (CpG-C oder M352), welches die Fähigkeit besitzt, hohe Mengen an IFN- α in PDCs zu induzieren, und gleichzeitig direkt B-Zellen aktiviert. Anhand dieses neuen CpG-Oligonukleotides ist es somit möglich, eine über TLR9 ausgelöste Immunantwort von B-Zellen und PDCs genauer zu skizzieren und die Verknüpfung von adaptiver und angeborener Immunität nachzustellen.

Gegenstand vorliegender Arbeit war somit die Analyse einer funktionellen Kooperation der beiden TLR9-tragenden Immunzellen, B-Zellen und PDCs. Ferner sollte in diesem System die Funktion von TLR9 in humanen B-Zellen genauer dargestellt werden. Anhand ausgewählter immunologischer Parameter wie z. B. der Zytokinsynthese, der Expression von Oberflächenmolekülen sowie der Produktion von Immunglobulinen sollte die Interaktion von B-Zellen und PDCs im humanen System genauer untersucht und die immunstimulatorischen Effekte der neuen CpG-Klasse (CpG-C) charakterisiert werden. Dabei sollte versucht werden ein geeignetes *in vitro*-Modell zu etablieren und folgende Fragestellungen zu beantworten: 1. Ist es möglich, eine Stimulation humaner B-Zellen über ihren B-Zell-Rezeptor und mittels CpG-DNA in Gegenwart von PDCs weiter zu verstärken? 2. Wenn ja, was sind die Mechanismen dieser T-Zell-unabhängigen Immunantwort? 3. Welche Rolle spielt IFN- α und TLR9 in diesem System? 4. Welche B-Zell-Subpopulation ist für diese Effekte verantwortlich?

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Geräte

FACSCalibur:	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg)
Cytomation MoFlo (High speed sorter)	Fa. Cytomation Inc. (Fort Collins, USA)
ELISA Reader:	Fa. Dynatech (Guernsey, Channel Islands, GB)
Zentrifuge Sepatech Omnifuge:	Fa. Heraeus (München)
Zentrifuge 5417R:	Fa. Eppendorf (Hamburg)
Begasungsbrutschrank:	Fa. Heraeus (Hanau)
Thermocycler Modell T3:	Fa. Biometra (Göttingen)
Thermocycler RoboCycler Gradient 40:	Fa. Stratagene (Heidelberg)
Mikroskop:	Fa. Zeiss (Jena)
Vortexer:	Fa. Janke & Kunkel (Staufen)
pH-Meter:	Fa. WTW (Weilheim)
Eismaschine:	Fa. Ziegra (Isernhagen)

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

PharM Lyse-Reagenz:	Fa. BD PharMingen (Heidelberg)
DMSO:	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Geneticin g-418 Sulfat:	Fa. GibcoBRL (Paisley, Schottland)
EDTA (kristallin):	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Heparin-Natrium:	Fa. Ratiopharm (Ulm)
Brefeldin A:	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
FACSFlow:	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg)
FACSSafe:	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg)
Trypan-Blau:	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.1.3 Reagenziensätze

Fix N Perm Kit:	Fa. An der Grub (Kaumberg, Österreich)
High Pure RNA Isolation Kit:	Fa. Roche (Mannheim)
First-Strand-cDNA Synthesis Kit:	Fa. Roche (Mannheim)
IFN- α ELISA:	Fa. BMS216MST (Wien, Österreich)
IL-6 ELISA Kit:	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
IL-10 ELISA Kit:	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
TNF- α ELISA Kit:	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
IgM/IgG ELISA KIT:	Fa. Bethyl. Lab. Inc. (Montgomery, USA)
BDCA-4 Dendritic Cell Isolation Kit:	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
CD 19 B cell Isolation Kit:	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
B cell Isolation Kit:	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
CD27 Microbeads:	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)

2.2 Materialien für die Zellkultur

RPMI 1640:	Fa. PAA laboratories (Linz, Österreich)
Humanes AB-Serum:	Fa. BioWhittaker (Wakersville MD, USA)
Fötale Kälberserum (FCS):	Fa. HyClone (Logan, Utah, USA),
Humanes Serum Albumin:	Fa. Pharmacia & Upjohn (Erlangen)
Ficoll-Hypaque Separationsmedium:	Fa. Biochrom KG (Berlin)
Penicillin:	Fa. PAA (Linz, Österreich)
Streptomycin:	Fa. PAA (Linz, Österreich)
L-Glutamin:	Fa. PAA (Linz, Österreich)
PBS (Phosphate buffered saline):	Fa. PAA (Linz, Österreich)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen), Falcon (Heidelberg), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, Frankreich), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, England) und Corning (Corning NY, USA) bezogen.

2.2.1 Zytokine und Antikörper

Brefeldin A:	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natural human Interferon- α :	Fa. Strathman Biotech AG;
Fab'2 anti-human IgM/IgG/IgA :	Fa. Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA)

2.2.2 Medium und Puffer

RPMI-Medium (incl. HEPES)
 10% Fötale Kälberserum (FCS)
 100 IU/ml Penicillin
 100 μ g/ml Streptomycin
 2 mM Glutamin

MACS-Puffer:
 Zur PDC-Isolation:
 PBS
 0,5% Humanes Serum Albumin
 pH=7,2-7,4

Zur B-Zell-Isolation:
 PBS
 0,5% Humanes Serum Albumin
 10% AB-Serum (Bio Whittaker)
 2 mM EDTA
 pH=7,2-7,4

TE-Puffer :
 10 mM Tris Chlorid
 1 mM EDTA
 pH=8,0

Wasser:

Es wurde stets deionisiertes Wasser aus der Hausleitung benutzt.

2.2.3 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Name	Spezifität	Klon	Isotyp	Fluoreszenz*	Herkunft
Anti-CD20	CD20	2H7	Maus IgG _{2b}	PE	BD PharMingen
Anti-CD27	CD27	M-T271	Maus IgG ₁	PE	BD PharMingen
Anti-HLA-DR	HLA-DR	L243	Maus IgG _{2a}	PerCP	BD PharMingen
Anti-IgD	IgD	G18-158	Maus IgG _{2a}	FITC	BD PharMingen
Anti-CD19	CD19	HIP19	Maus IgG ₁	APC	BD PharMingen
Anti-BDCA-2	BDCA-2	AC144	Maus IgG ₁	PE	Miltenyi Biotec
Anti-CD80	CD80	BB1	Maus IgGM	PE	BD PharMingen
Anti-CD86	CD86	2331	Maus IgG ₁	APC	BD PharMingen
Anti-CD38	CD38	HIT2	Maus IgG ₁	APC	BD PharMingen
Anti-CD11c	CD11c	B-ly6	Maus IgG ₁	APC	BD PharMingen
Anti-CD123	CD123	9F5	Maus IgG ₁	PE	BD PharMingen
Anti-rat IgG _{2a}	Ratte IgG _{2a}	RG7/1.30	Maus		BD PharMingen
Streptavidin-APC	Streptavidin	-	-	APC	BD PharMingen
Anti-Hu-IL-6	IL-6	AS12	Maus IgG ₁	PE	BD PharMingen
Anti-IFN- α	IFN- α	Poly	Hase		PBL
Anti-IFN Typ I Rezeptor	IFN-Rezeptor	Poly	Maus		PBL
<i>Lineage</i> cocktail1 (lin1)		CD3,CD14,CD16,CD19,CD20,CD56	Maus IgG ₁	FITC	BD PharMingen

*nur bei FACS-Antikörper

2.3 CpG-Oligonukleotide

Alle CpG-Oligonukleotide, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden bezogen von der Fa. Coley Pharmaceutical Group (Wellesley MA, USA) oder von der Metabion GmbH (Martinsried, BRD). Alle CpG-Oligonukleotide waren Endotoxin-getestet (unter 0,03 EU/ml, LAL-Assay, Fa. BioWhittaker [Wakersville MD, USA]) und wurden, falls nicht ausdrücklich etwas anderes angemerkt ist, in einer Konzentration von 3 μ g/ml eingesetzt. Verwendet wurden CpG-B-ODN (ODN 2006) und CpG-C-ODN (M352). Die Stocklösungen wurden in TE-Puffer angesetzt; weitere Verdünnungen wurden mit PBS vorgenommen. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über die Sequenzen der verwendeten CpG-Oligonukleotide:

Name	Länge	Sequenz vom 5' zum 3' Ende	Rückgrat	Kommentar
2006	24-mer	5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3'	Phosphorothioat	Typ B Oligo
M352	20-mer	5'-TCG TCG TCG TTC GAA CGA CGT-GAT3'	Phosphorothioat	Typ C Oligo

Tabelle 2.1: Übersicht zu den verwendeten Oligonukleotiden; Großbuchstabe: Phosphorothioat-Bindung am 3' Ende der Base; fett: CpG-Dinukleotide

2.3.1 Primer für die Amplifikation der TLR-kodierenden Gene

Alle Primerpaare, die in der *real-time*-PCR eingesetzt wurden, wurden freundlicherweise von der Fa. Search-LC (Heidelberg, BRD) zur Verfügung gestellt. Die jeweiligen Primercharakteristika sind in Tabelle 2.2 detailliert wiedergegeben.

Zielgen	Accession Code	Position des Amplikons	Amplifikationseffizienz	Genomische DNA (5 ng/ ml)	Transkripte/ 2 * 10 ⁶ PBMCs	Transkripte/ 300 HEK 293 Zellen
Cyclophilin-B	60857	05–358	1.95	k. A. ¹	1,6 * 10 ⁶	12,396
TLR1	NM_003263	1919–2254	1.86	886	415,704	1
TLR2	NM_003264	1549–1819	1.90	864	323,971	10
TLR3	NM_003265	1505–1717	1.93	858	16,134	12
TLR4	NM_003266	439–767	1.91	1130	317,530	0
TLR5	U88881	733–982	1.93	695	37,757	22
TLR6	NM_003268	2378–2650	1.93	1791	117,269	4
TLR7	AF245702	774–1012	1.98	563	23,972	0
TLR8	AF245703	2296–2590	1.95	831	60,790	0
TLR9	AF245704	2741–2941	1.95	853	66,799	2
TLR10	AF296673	1767–2054	1.90	785	53,267	0

Tabelle. 2.2: Übersicht zu den verwendeten Primern

¹ k. A. keine Angabe.

Die Primerpaare wurden so konzipiert, dass Intron-überspannend amplifiziert wurde. Die entsprechenden Daten wurden in diesen Ansätzen nicht erhoben. Gen Bank, NCBI.

2.4 Zellulär – immunologische Methoden

2.4.1 Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit bei einem Anteil von 5% CO₂ in der Atmosphäre vorgenommen. Als Kulturmedium wurde immer, wenn nicht explizit etwas anderes angemerkt ist, Vollmedium verwendet.

2.4.2 Bestimmung von Zahl und Vitalität der Zellen

Zur Bestimmung des Anteils der lebenden Zellen wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Hierbei färben sich tote Zellen im Gegensatz zu lebenden blau an. Die Zellzahl wurde nach geeigneter Verdünnung der Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt.

2.4.3 Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut

Zur Isolation peripherer Blutlymphozyten (PBMC = *peripher blood mononuclear cells*) wurden entweder *buffy coats* oder frisches Spenderblut von gesunden Probanden aus der Kollegenschaft im Labor verwendet. *Buffy coats* wurden aus dem Vollblut gesunder Spender gewonnen und vom Bayerischen 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 plasmastreifen zellulären Bestandteilen des Blutes mit einem reduzierten Gehalt an Erythrozyten. Die Isolation der PBMCs erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation über "Ficoll-Hypaque"-Lösung. Ficoll bzw. Biocoll besitzt aufgrund seiner spezifischen Dichte von 1,077 g/ml die Eigenschaft, in einer Dichte-Zentrifugation mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) an der Phasengrenze zwischen Blutserum und Biocoll anzureichern. Wegen ihrer höheren Dichte sedimentieren Erythrozyten und Granulozyten in bzw. unter der Biocollschicht. Thrombozyten hingegen finden sich wegen ihrer geringeren Dichte in der Serumschicht oberhalb des Biocoll.

Bei Isolation von PBMCs aus *buffy coats* wurde das Blut mit einer Perfusorspritze steril dem Plastikbeutel entnommen, im Verhältnis 1:2 mit PBS (= *Phosphate-buffered saline*) verdünnt und in einem 50 ml Polypropylen-Röhrchen über 15 ml Biocoll (= Ficoll) aufgeschichtet, so dass zwei Phasen entstanden. Bei Verwendung von frischem Spenderblut wurde ebenfalls im gleichen Verhältnis mit PBS verdünnt, allerdings wurden zur Separation Leucosep-Röhrchen verwendet, in die ebenfalls zuvor 15 ml Biocoll bei Raumtemperatur mittels Zentrifugation unter die Separationsmembran eingebracht worden war. Anschließend wurde in beiden Fällen 30 min lang bei 1000 g ohne Bremse zentrifugiert, die Zellen in der Interphase vorsichtig - in möglichst kleinem Volumen, um wenig Biocoll mit aufzunehmen - mit einer Pipette aspiriert. Danach wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen (Zentrifugation 10 min bei 400 g und 4°C), bevor sie in 5 ml Ortholyse-Reagenz aufgenommen wurden, in dem sie 5 min inkubiert wurden. Nach der erfolgten Ortholyse der verbliebenen Erythrozyten wurde noch einmal gewaschen und schließlich die Viabilität der Zellen durch Ausschluss der trypanblau-gefärbten Zellen bestimmt. Die Viabilität belief sich in der Regel auf >95%.

2.4.4 Isolation von plasmazytoiden dendritischen Zellen

Plasmazytoide dendritische Zellen wurden wegen ihrer geringen Frequenz im peripheren Blut aus PBMCs mittels magnetischer Zellauftrennung ("Zellsortens") (MACS = *Magnetic activated cell sorting*) isoliert. Hierzu wurde nach dem Protokoll von Miltenyi Biotech zur Isolation von plasmazytoiden dendritischen Zellen mit dem BDCA-4-Kit vorgegangen.

BDCA-4 (= *Blood dendritic cell antigen*) ist ein Oberflächenmolekül, das vor allem auf plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert wird. Die PBMCs wurden zunächst durch einen 40 µm Nylonfilter von Zellklumpen befreit und dann entsprechend dem Protokoll des Herstellers 15 Minuten mit dem magnetisch markierten Anti-BDCA-4-Antikörper (BDCA-4 Mikropartikel) sowie mit einem Fc-Rezeptor-blockierenden Agens bei 8-12°C inkubiert. Das Fc-Rezeptor blockierende Agens diente dazu, unspezifische Bindungen des Antikörpers an Fc-Rezeptoren zu verhindern. Nach einem Waschschritt wurde die Zellsuspension in eine in einem Magnetfeld stehende Selektionssäule (LS-Säule, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, BRD, Bettvolumen: 3ml) appliziert. Durch die magnetische Markierung wurden die plasmazytoiden dendritischen Zellen in

der Säule zurückgehalten. Die ungebundenen Zellen passierten die Säule. Nach mehrmaligem Waschen der Säule mit MACS-Puffer wurde die Selektionssäule aus dem Magnetfeld herausgenommen. Die positiv selektionierten plasmazytoiden dendritischen Zellen wurden mit Druck aus der Säule gespült. Um eine höhere Reinheit zu erhalten, wurde die Zellfraktion nach einem weiteren Waschschrift nochmals über eine kleinere Säule mit kleinerem Bettvolumen (MS-Säule, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, BRD, Bettvolumen: 1ml) aufgetrennt. Für alle Isolationsschritte wurde ein spezieller Puffer (MACS-Puffer) verwendet. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. Die Viabilität der Zellen wurde durch Ausschluss der trypanblau-gefärbten Zellen bestimmt und belief sich in der Regel auf >95%. Die durchflusszytometrisch untersuchte Reinheit der auf diese Weise erhaltenen plasmazytoiden dendritischen Zellen lag je nach Spender zwischen 70 und 100%. Alle Experimente wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom (LaminAir HB 2448, Heraeus, München, BRD) durchgeführt.

2.4.5 Isolation von humanen B-Lymphozyten

Humane B-Lymphozyten wurden ebenfalls aus PBMCs aus *buffy coats* oder frischem Spenderblut mit dem CD19 B-Zell-Isolationskit (nach dem MACS-Prinzip) isoliert. PBMCs wurden zunächst durch einen 40 µm Nylonfilter von Zellklumpen befreit und dann entsprechend dem Protokoll des Herstellers zunächst 15 Minuten mit magnetisch markierten CD19-Antikörpern bei 8-12°C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde die Zellsuspension in eine in einem Magnetfeld stehende Selektionssäule (LS-Säule, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, BRD, Bettvolumen: 3ml) appliziert und diese danach mehrmals mit MACS-Puffer gewaschen. Durch die magnetische Markierung wurden die CD19 positiven B-Zellen in der Säule zurückgehalten, anschließend aus dem Magnetfeld herausgenommen und die positiv selektionierten humanen B-Lymphozyten mit Druck aus der Säule gespült. Die Viabilität der Zellen wurde durch Ausschluss der trypanblau-gefärbten Zellen bestimmt und belief sich in der Regel auf >95%. Die durchflusszytometrisch untersuchte Reinheit der auf diese Weise erhaltenen B-Lymphozyten war meistens >95%. Der für die Aussagekraft der Versuche wichtige Anteil von plasmazytoiden dendritischen Zellen lag stets bei <1%, d.h. es waren im FACS keine plasmazytoiden dendritischen Zellen (CD11c⁻, CD123⁺, lin⁻, BDCA-2⁺) nachweisbar.

2.4.6 Isolation von naiven und memory B-Lymphozyten

Naive und memory B-Lymphozyten wurden aus PBMCs in einem Zwei-Schritt-Verfahren gewonnen. Zunächst wurden mit dem B-Zell-Isolations-Kit (nach dem MACS-Prinzip) unberührte B-Lymphozyten aus den PBMCs isoliert. Dazu wurden im ersten Schritt PBMCs 10 Minuten mit einer Mischung aus Hapten-gekoppelten Antikörpern (Hapten-Antibody Cocktail) gegen T-Zellen (CD2, CD4), NK-Zellen (CD11b), Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen, Basophile, Thrombozyten und Erythrozyten (CD16, CD36 und anti-IgE Antikörper) bei 8-12°C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen mit einem magnetisch markierten Anti-Hapten-Antikörper (MACS Anti-Hapten Micropartikel) für weitere 15 Minuten bei 8-12°C inkubiert. Bei der anschließenden Auftrennung in einer Säule (LS-Säule, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD, Bettvolumen: 3ml) in einem Magnetfeld wurden alle markierten Zellen zurückgehalten. Die unmarkierten B-Zellen, die keinen der oben erwähnten Antikörper binden, liefen durch die Säule durch und konnten unten aufgefangen werden.

In einem zweiten Schritt wurden diese unberührten B-Zellen dann entsprechend dem Protokoll des Herstellers 15 Minuten mit dem magnetisch markierten Anti-CD27-Antikörper (CD27 Mikropartikel) sowie mit einem Fc-Rezeptor-blockierenden Agens bei 8-12°C inkubiert. Das Fc-Rezeptor-blockierende Agens diente dazu, unspezifische Bindungen des Antikörpers an Fc-Rezeptoren zu verhindern. Es wurde bewiesen, dass unterschiedliche Expression von CD27 auf humanen B-Zellen ein gutes Mittel ist, diese in ihre Untergruppen aufzuteilen. So wird CD27 nur auf memory B-Zellen, nicht aber auf naiven B-Zellen exprimiert. Durch die magnetische Markierung der CD27-positiven, reifen memory B-Zellen wurden diese in der Säule im Magnetfeld zurückgehalten. Die unmarkierten CD27-negativen naiven B-Zellen hingegen liefen in der anschließenden Auftrennung durch die Säule hindurch und konnten unten aufgefangen werden. Für alle Isolationsschritte wurde ein spezieller Puffer (MACS-Puffer) verwendet. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. Die durchflusszytometrisch ermittelte Reinheit der auf diese Art und Weise erhaltenen, unmarkierten naiven CD27⁻ B-Zellen und der positiv selektierten CD27⁺ memory B-Zellen lag je nach Spender zwischen 70% und 100%.

Um nun die Interaktion von B-Zellen und PDCs zu untersuchen wurden PBMCs aus *buffy coats* isoliert und nach Feststellung der Zellviabilität und der Zellzahl mittels Trypan-blau (>95%) in zwei Hälften aufgeteilt: die erste Hälfte der PBMCs wurde benutzt, um plasmazytoide dendritische Zellen aus PBMCs nach dem MACS-Prinzip zu isolieren. Hierzu wurde nach dem Protokoll von Miltenyi Biotech zur Isolation von plasmazytoiden dendritischen Zellen mit dem BDCA-4-Kit vorgegangen. Die zweite Hälfte der PBMCs wurde dazu verwendet, humane B-Lymphozyten aus PBMCs mit dem CD19 B-Zell-Isolationskit (nach dem MACS-Prinzip) zu isolieren. Um nun herauszufinden, ob PDCs die B-Zell-Aktivierung auch in autologer Zellkultur unterstützen, wurden humane B-Zellen in bestimmten Konzentrationen (siehe Ergebnisteil) entweder alleine oder in der Gegenwart von PDCs mit CpG-C (immer 3 µg/ml) und mit oder ohne Anti-Ig (immer 10 µg/ml) in einem Volumen von 200 µl in 96-Rundbodenwells bei 37°C inkubiert. Für eine Übersicht des Versuchsansatzes dient **Abbildung 2.1**.

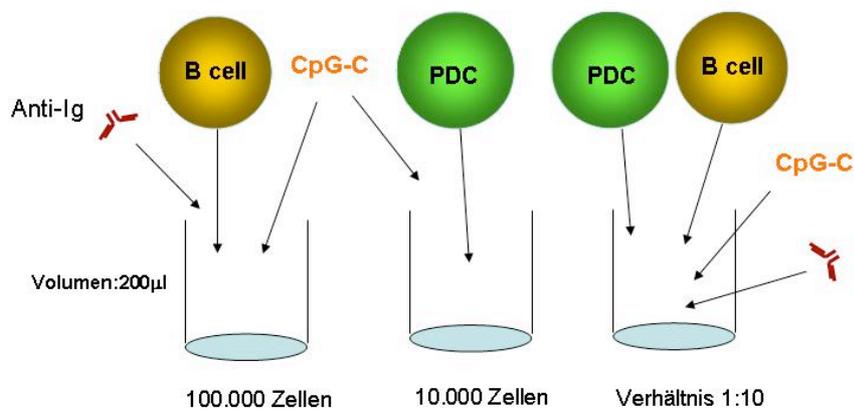


Abbildung 2.1 Zellkultur von B-Zelle und PDC

2.5 Transwell-Experimente

In einigen Experimenten wurde ein Transwell-Kokultursystem verwendet (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark), in dem die untere Zellkammer von der oberen durch eine 0,2 µm *Anapore*-Membran getrennt ist. Durch die 0,2 µm-Membran ist ein Austausch löslicher Faktoren möglich, nicht jedoch direkter Zell-Zell-Kontakt. Isolierte B-Zellen (500.000 CD19⁺CD20⁺ B-Zellen) wurden in 500 µl RPMI-Medium aufgenommen und in die un-

tere Kammer pipettiert und dort mit Anti-Ig (10 µg/ml) und CpG-C (3 µg/ml) stimuliert, während isolierte PDCs (50.000 PDC in 500 µl RPMI-Medium) in die obere Kammer gegeben wurden. Für eine Übersicht dient **Abbildung 2.2**.

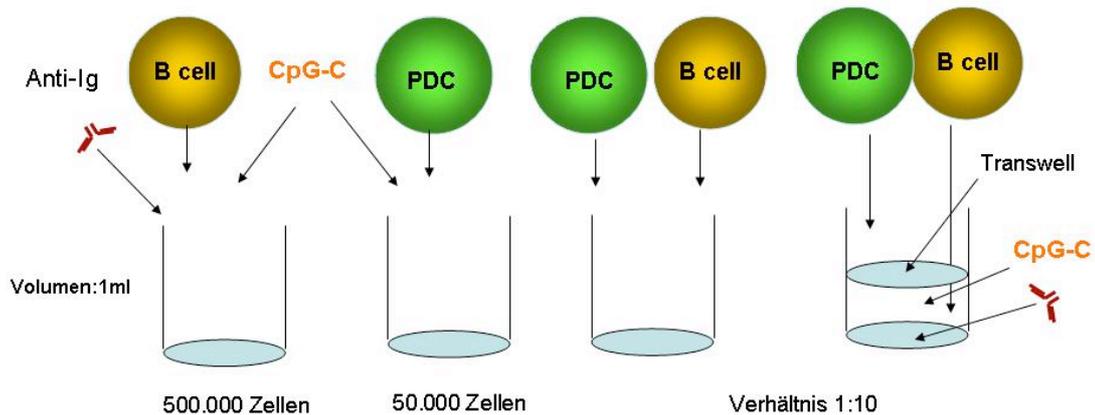


Abbildung 2.2 Das Transwell-Experiment

2.6 Quantifizierung der Zytokin- und Immunglobulinsekretion mit dem ELISA-Test (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

2.6.1 Quantifizierung von Interferon- α

Zur Konzentrationsbestimmung von Interferon- α wurde ein fertiges ELISA-Kit verwendet. Der Detektionsbereich des ELISAs lag bei 8-500 pg/ml. Dieser ELISA detektiert vor allem die IFN- α -Isoformen IFN- α 2a und IFN- α 2b, nicht jedoch IFN- α B und IFN- α F. Das Testprinzip besteht darin, dass die im abgenommenen Überstand der Zellkultur gelösten Zytokine an spezifische Antikörper binden, mit denen der Boden der Vertiefungen der ELISA-Platte beschichtet ist. In einem zweiten Schritt bindet dann ein zweiter Antikörper, der an Biotin gekoppelt ist, ein anderes Epitop des Zytokins. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten werden die Vertiefungen immer mehrmals mit einem Waschpuffer gespült. Im dritten Schritt wird dann mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase inkubiert, wobei die Streptavidin-Moleküle eine feste Bindung

mit den Biotin-Molekülen eingehen. Die Meerrettichperoxidase katalysiert eine quantifizierbare entsprechende Reaktion mit einem anschließend zugegebenen Farbstoff, die der Menge des in der Probe vorhandenen Zytokins proportional ist. Nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure (2M H₂SO₄) wurde die Messung der durch den umgesetzten Farbstoff hervorgerufenen Absorption direkt im Anschluss mit dem ELISA-Reader MRX (Dyntech Laboratories, San Diego, USA) bei der in der Anleitung empfohlenen Wellenlänge (450nm) vorgenommen. Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich mit einer in Doppelwerten angefertigten Standardkurve.

2.6.2 Quantifizierung von Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- α

Zur Konzentrationsbestimmung von Interleukin-6 (Detektionsbereich: 5-300 pg/ml), Interleukin-10 (Detektionsbereich: 8-500 pg/ml), TNF- α (Detektionsbereich: 8-500 pg/ml) wurden ELISA-Kits zum Selbstbeschichten verwendet. Das Testprinzip ist, dass die Wände der Vertiefungen von 96-Well-Maxisorbplatten über Nacht mit Antikörpern gegen das zu messende Zytokin beschichtet werden. Zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen wird die Platte am nächsten Tag mit einem Blockierungsreagenz (fötales Kälberserum) geblockt, bevor dann die Proben und die Standardkurve in die Vertiefungen pipettiert werden. Im Unterschied zu den fertigen ELISAs wurden bei den Kits zum Selbstbeschichten die Biotin-konjugierten Antikörper gegen das zu bestimmende Zytokin zeitgleich mit dem Streptavidin in die Platte pipettiert. Die Zugabe des Farbstoffes und die Auswertung am ELISA-Reader erfolgte in der gleichen Art und Weise wie beim IFN- α -ELISA.

2.6.3 Quantifizierung von IgM und IgG

Das Testprinzip dieses ELISAs (Detektionsbereich: 8-10000 ng/ml) ist, dass die im abgenommenen Überstand der Zellkultur gelösten Immunglobuline an die spezifischen Antikörper (*capture antibody*) binden, mit denen der Boden der Vertiefungen der ELISA-Platte beschichtet ist. In einem zweiten Schritt wird zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen die Platte mit einem Blockierungsreagenz (50mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA, pH 8,0) geblockt, bevor dann die Proben und die Standardkurve in die Vertiefungen pipettiert werden. Im dritten Schritt wird mit einem mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP = *Horseradish Peroxidase*) markiertem Antikörper inku-

biert, wobei der Antikörper an ein anderes Epitop des Immunglobulintyps bindet und die Peroxidase eine quantifizierbare Reaktion einleitet, die der Menge des in der Probe vorhandenen Immunglobulintyps proportional ist. Nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure (2M H₂SO₄) wurde die Messung der durch den umgesetzten Farbstoff hervorgerufenen Absorption direkt im Anschluss in einem ELISA-Reader bei der in der Anleitung empfohlenen Wellenlänge (450nm) vorgenommen. Die Auswertung am ELISA-Reader erfolgte in der gleichen Art und Weise wie oben beschrieben.

2.7 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

2.7.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die FACS-Analyse (*fluorescence-activated cell sorting*) bietet die Möglichkeit, Größe, Granularität und Oberflächenantigene von Zellen darzustellen und zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit an Fluorochromen gebundenen Antikörpern gegen das zu messende Oberflächenantigen markiert und in einem Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch eine Messkammer geführt. Hier wird der Zellstrom in der Trägerflüssigkeit auf das Küvettenzentrum verengt und beschleunigt, so dass die Zellen einzeln in ausreichendem Abstand voneinander am Messpunkt vorbeifließen. Am Messpunkt führen Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre Granula zu einer Lichtstreuung des einfallenden Laserstrahls, die durch je einen Photodetektor in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einen im rechten Winkel dazu liegenden (Seitwärtsstreulicht) registriert und in elektrische Signale umgewandelt wird. Das Durchflusszytometer ist mit zwei verschiedenen Lasern ausgestattet, die monochromatisches Licht bestimmter Wellenlänge emittieren und somit die benutzten Fluorochrome zur Fluoreszenz anregen. Ein luftgekühlter Argonlaser emittiert monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm und ein Diodenlaser emittiert monochromatisches Licht der Wellenlänge 635 nm.

Die Intensität des Vorwärtsstreulichts wird im Wesentlichen durch die Zellgröße, die des Seitwärtsstreulichts durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Der Laserstrahl regt weiterhin das Fluorochrom der für die Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper zur Emission von Lichtquanten an, die ebenfalls in Linsen gesammelt werden. Dabei trennen Filter das gesammelte Licht und lenken es, nach den Wellenlängenberei-

chen aufgetrennt, zu verschiedenen Photodetektoren. So können Signale verschiedener Wellenlänge voneinander getrennt aufgenommen und analysiert werden (Mehrfarbenanalyse). Die gemessene Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Zahl der pro Zelle gebundenen Antikörper gegen das untersuchte Oberflächenantigen.

2.7.2 FACS-Analyse

Für FACS-Analysen wurden 5×10^4 bis 1×10^5 Zellen in FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen im rücklaufenden Tropfen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im Dunkeln bei 4°C mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) (Bandpassfilter 530 nm), Phycoerythin (PE) (Bandpassfilter 585 nm), Peridin-Chlorophyll-Protein (PerCP) (Bandpassfilter 670 nm) oder Allophycocyanin (APC) (Bandpassfilter 660 nm) gekoppelten Antikörpern für 15-30 min inkubiert. Diese fluoreszierenden Farbstoffe strahlen in der angegebenen Reihenfolge in die Kanäle 1-4, die mit dem verwendeten FACSCalibur analysiert werden konnten. Für jeden Antikörper wurde ein passender IgG-Isotyp im Kontrollansatz verwendet (alle von PharMingen Becton Dickinson, Heidelberg, BRD).

Bei intrazellulären Färbungen wurden, wie oben beschrieben, zuerst die Oberflächenantigene angefärbt. Nach dem Waschen wurden die Zellen allerdings mit dem Fix and Perm-Kit nach der Anleitung des Herstellers fixiert und permeabilisiert und damit eine Anfärbung von intrazellulären Zellbestandteilen ermöglicht. Zunächst wurden die Zellen 15 min bei Raumtemperatur mit Paraformaldehyd fixiert und nach einmaligem Waschen mit PBS dann 15 min permeabilisiert. Gleichzeitig mit dem Permeabilisationreagenz wurden die Antikörper gegen die intrazellulären Moleküle dazu pipettiert. Folgender Antikörper gegen intrazelluläre Proteine wurde verwendet: Anti-IL-6-PE (PharMingen Becton Dickinson, Heidelberg, BRD). Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen danach direkt auf einem Durchflusszytometer Modell FACSCalibur mit der CellQuest-Software analysiert.

2.7.3 Die Bestimmung der Reinheit von PDC- und B-Zell-Präparationen

Die Bestimmung der Reinheit der plasmazytoiden dendritischen Zelle erfolgte durch Detektion mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD123, *Lineage*-cocktail-1, HLA-DR (HLA-DR = *Human leukocyte antigen* DR; MHC II) und BDCA-2. Plasmazytoide dendritische Zellen sind als CD123-positive, *Lineage*-cocktail-1-negative, HLA-DR positive und BDCA-2-positive Zellen definiert⁶⁹ und lassen sich somit klar von den

übrigen mononukleären Zellen abgrenzen. Die Bestimmung der Reinheit der humanen B-Zellen erfolgte je nach Experiment durch Detektion mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD20, IgD, CD27 und CD38. Mittels dieser Marker ließen sich B-Zellen klar von den übrigen mononukleären Zellen abgrenzen¹⁶⁹.

2.7.4 Bestimmung des Plasmazellanteils von humanen B-Zellen

Zum Nachweis, ob humane B-Zellen den Phänotyp einer Plasmazelle angenommen haben, eignen sich die Oberflächenmarker CD20 und CD38¹⁷⁰⁻¹⁷². Es wurde beschrieben, dass der beste Zeitpunkt, um Plasmazellen im FACS sichtbar zu machen bei ca. acht Tagen (d) liegt⁹⁷. Daher wurden PDCs und B-Zellen für acht Tage inkubiert und dann durchflusszytometrisch auf die Generierung von Plasmazellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit den fluoreszierenden FACS-Antikörpern (anti-CD20 PE und anti-CD38 APC) markiert. Der Anteil der entstandenen Plasmazellen entspricht der Zunahme der CD20⁻ und CD38⁺ B-Zellen. Um den Anteil der Plasmazellen im FACS quantitativ zu analysieren, wurde der Anteil an CD38⁺ und CD20⁻ B-Zellen als Plasmazellen gewertet. Die Zahl der Plasmazellen wurde im FACS mittels Quadrantenanalyse gemessen und ist in den Diagrammen als relative Zahl der CD38⁻/CD20⁺ dargestellt.

2.7.5 Zellauftrennung (“Sorten”) von humanen B-Zell-Subpopulationen

Prinzip:

Der Terminus “Sorter” bezieht sich in der Durchflusszytometrie auf die Fähigkeit von FACS-Geräten bestimmte Subpopulation durch die Anlage eines Gates im FACS-Gerät zu definieren und diese aus der Zellprobe zu isolieren (zu “sorten”). Dabei besteht das jeweilige Konzept eines Sorters aus folgenden Bestandteilen:

1. In der hydrodynamischen Fokussierung (d.h. der Verengung des Zellstromes in der Trägerflüssigkeit auf das Küvettenzentrum) einer gemischten Zellpopulation in der FACS-Flüssigkeit (*fluid sheath*).
2. In der Analyse der Zellen auf Granularität, Größe (Scatter) und Fluoreszenz mit einem Laserstrahl, der die Zellen nach diesen Kriterien auftrennt.
3. In der jeweiligen Definition einer Region oder eines Gates der zu isolierenden Subpopulationen. Es gibt zwei Mechanismen Zellen in ihre Untergruppen aufzuteilen: mechanisch und elektrostatisch.

Das mechanische Vorgehen besteht in einer hydrodynamischen Fokussierung der Zellen, gefolgt von einer Auftrennung der Zellpopulation mit dem Laserstrahl und der Ablenkung der aufgetrennten Zellen durch einen akustischen Impuls in das jeweilige Auffanggefäß (*catcher tube*).

Das elektrostatische Vorgehen, welches in dieser Arbeit benutzt wurde, besteht in einer hydrodynamischen Fokussierung der Zellen und in der Generierung eines in Tröpfchen abbrechenden Zellflusses (*stream*). Dieser wird durch eine stetige Vibration der fokussierten Zellen in einer Glaskapillare, der so genannten *nozzle*, erreicht. Als nächster Schritt erfolgt die Laserauftrennung und Signalverarbeitung der Fluoreszenzen, wodurch die "Sortentscheidung" getroffen wird (z.B. weiß rechts sorten, blau links sorten, grün oder schwarz nicht sorten). Die Zellen werden dann je nach der "Sortentscheidung" elektrisch aufgeladen und anhand eines angelegten elektrostatischen Feldes (± 3000 Volt) deflektiert. Entsprechend ihrer Spannung können die Subpopulationen dann abgelenkt und schließlich in Röhrchen, Platten, Slides und Multiwell-Platten aufgefangen und direkt in Kultur gegeben werden. In der Regel entsprach die Gesamtzellzahl der gesorteten B-Zellen 80% der ursprünglich eingesetzten Menge mit der Tendenz, dass diese für sehr kleine Subpopulationen stark abnahm.

Um nun reine B-Zell-Subpopulationen zu erhalten, wurden CD19⁺B-Zellen (n=3) aus dem peripheren Blut isoliert und nach der Isolation mit Anti-CD27 PE und Anti-IgD FITC fluoreszenzmarkiert. Die durchflusszytometrisch ermittelte Reinheit der isolierten B-Zellen lag bei >95%. Die mit Anti-CD27 PE und Anti-IgD FITC fluoreszenzmarkierten B-Zellen wurden dann mit dem MoFlo Hochgeschwindigkeits-Zellsorter in ihre Untergruppen (CD27⁻, IgD⁺ naive B-Zellen, und CD27⁺, IgD⁻ memory B-Zellen) aufgetrennt, wieder aufgefangen und für 12h ohne die Zugabe eines Stimulus in RPMI-Medium (10% FCS) in 200 µl 96-Rundbodenwells bei 37°C inkubiert (jeweils mindestens 300.000 Zellen pro Subpopulation). Als schematische Übersicht dient **Abbildung 2.3**.

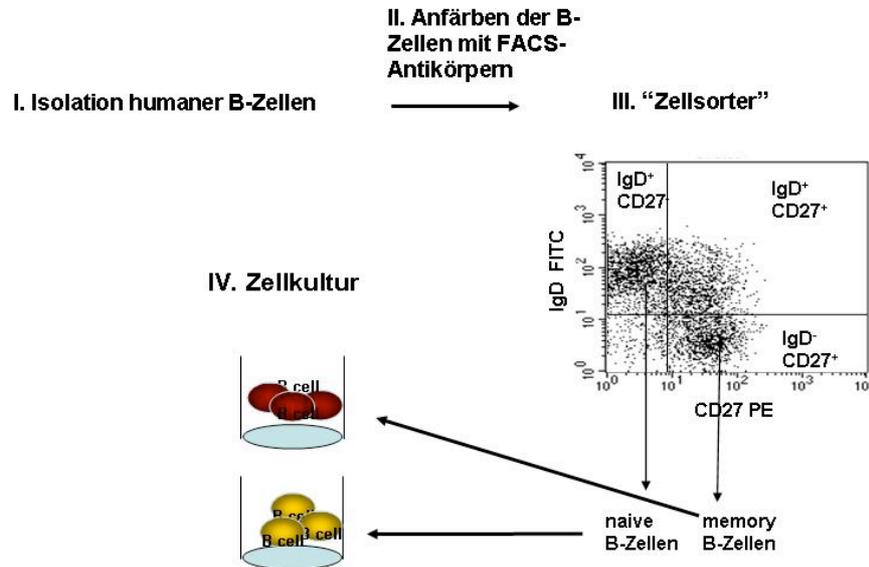


Abbildung 2.3 Das Prinzip des Zellsortens

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Isolation von RNA aus humanen B-Zellen

Zur Isolation von RNA aus humanen B-Zellen wurde der *High Pure RNA Isolation Kit* (von Roche) verwendet. Dazu wurden zunächst ca. 10^6 der aufgereinigten Zellen, die nach oben beschriebenen Prinzipien aus PBMCs gewonnen worden waren, in 200 μ l PBS resuspendiert. Nach Zugabe eines speziellen Lyse-/Bindepuffers (400 μ l), der innerhalb weniger Sekunden die Zellen lysiert und gleichzeitig die RNAsen inaktiviert, wurde die Probe in einem zweiteiligen Auffanggefäß zentrifugiert (15s bei 10000 rpm = 8000g). Die RNA adsorbierte dabei an das Glasfaservlies des Filters im oberen Reservoir, während die anderen Zellbestandteile in das untere Reservoir liefen und anschließend verworfen wurden. Da am Glasfaservlies alle Nukleinsäuren spezifisch binden, mußte die Probe danach mittels einer enzymatischen Verdauungsreaktion von kontaminierender DNA befreit werden, was durch Inkubation mit DNase I (10 μ l) für 15 min bei 15-25°C geschah. Nach darauf folgenden drei Waschschritten mit den mitgelieferten Waschpuffern und anschließender Zentrifugation konnte die RNA frei von Begleitsub-

stanzen wie z.B. Salzen, Proteinen und anderen zellulären Verunreinigungen mit einem Elutionspuffer (50-100 µl) aus dem Filter gewaschen werden.

2.8.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Zur Amplifikation über PCR mußte die RNA revers transkribiert und in einen cDNA-Einzelstrang umgeschrieben werden. Dazu wurde der *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* verwendet. Die RNA wurde zusammen mit dem *Master Mix* (enthält Reaktionspuffer, MgCl₂ (25 mM), einen Deoxynukleotid-Mix, Oligo-p(dT)₁₅ Primer, RNase Inhibitor und AMV Reverse Transkriptase) und wird kurz vor der Reaktion zusammenpipettiert wurde, für 10 Minuten bei 25°C und anschließend für 60 Minuten bei 42°C inkubiert. In der ersten Inkubation binden dabei die Primer an die RNA-Matrize und werden anschließend revers transkribiert, was zur cDNA-Synthese in der zweiten Inkubation führt. Danach wurde die AMV Reverse Transkriptase durch fünfminütiges Erhitzen des Reaktionsgemischs auf 95°C und anschließendes Abkühlen auf 4°C für ebenfalls fünf Minuten denaturiert, um eine Kontamination der cDNA, die zu Beeinträchtigungen bei folgenden Untersuchungen führen könnte, zu vermeiden.

2.8.3 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Allgemeines Funktionsprinzip

Das Verfahren der PCR ermöglicht es, ein spezifisches DNA-Stück aus einem komplexen Nukleinsäuregemisch (genomische DNA, Plasmid-DNA, cDNA) zu amplifizieren. Diese spezifische, zu amplifizierende DNA-Matrize wird hierbei auch als *template* bezeichnet. Die Reaktion erfolgt mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und einem sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaar, das den Enden des *templates* homolog ist. Die Reaktion durchläuft drei Schritte: 1. Denaturierung und bei doppelsträngiger DNA Aufschmelzen der beiden Stränge der Matrizen-DNA (Denaturierung), 2. spezifische Hybridisierung der Primer an die homologe Zielsequenz auf der DNA (Anlagerung) und 3. von den Primern ausgehende DNA-Synthese (Elongation). Das so synthetisierte DNA-Fragment kann in der darauffolgenden Amplifikationsrunde als Matrize für den anderen Primer dienen. Dadurch ist in mehreren aufeinander folgenden Zyklen eine exponentielle Anreicherung einer beliebigen DNA-Sequenz, die zwischen den beiden Primern liegt, möglich. Für die PCR Reaktion wurde das *LightCycler*

– *FastStart DNA Master SYBR Green I Kit* (von Roche Diagnostics) nach folgendem Ansatz verwendet:

Reagenz	Menge	Endkonzentration
cDNA	10 μ l	
dATP	} 2 μ l	200 μ M
dGTP		200 μ M
dCTP		200 μ M
dUTP		200 μ M
Polymerase		2 U/ml
PCR-Puffer		
MgCl ₂		2 mM
SYBR Green I		
Primer Sense	1 μ l	0,5 μ M
Primer Antisense	1 μ l	0,5 μ M
H ₂ O	6 μ l	

2.8.4 *Hot-start-Verfahren*

Zu Beginn der PCR kommt es wegen den anfänglich noch niedrigen Temperaturen zu unerwünschten Effekten wie Fehlhybridisierung der Primer oder Primerdimerbildung, die im weiteren Verlauf zu einer schlechten Ausbeute oder zu unspezifischen Produkten führen. Mit dem *hot-start*-Verfahren kann man diesem Problem begegnen, indem man die DNA-Polymerase erst hinzufügt, wenn die richtige Arbeitstemperatur erreicht wird. Eine alternative Methode ist es, die Polymerase durch hitzelabile Co-faktoren so zu behindern, dass sie erst bei deren Denaturierung aktiv wird.

Ein solches Verfahren wurde in dieser Arbeit mit dem Einsatz der *FastStart Taq DNA Polymerase* (von Roche Diagnostics) angewendet. So wurde eine zweiminütige Denaturierungsphase von 95°C jeder PCR vorgeschaltet, um eine optimale Aktivierung der Polymerase zu erzielen.

2.8.5 *Touch-down-Verfahren*

Eine weitere Modifikation der PCR, die eine Fehlhybridisierung der Primer am Anfang der PCR verhindern kann, ist das so genannte *touch-down*-Verfahren. Da sich Fehlhybridisierungen, die zu einem frühen Zyklus stattfinden, besonders stark bei dem quantitativen Ergebnis einer PCR auswirken, ist es von Vorteil, besonders in der frühen

Phase der PCR für eine hohe Spezifität zu sorgen. Dies lässt sich unter anderem dadurch erreichen, dass man eine höhere Primer-Anlagerungstemperatur in der ersten Hälfte der PCR wählt und diese dann schrittweise der optimalen Anlagerungstemperatur der Primer über mehrere Zyklen angleicht. Somit kommt es zwar zu Beginn der Reaktion zu einer geringeren Amplifikation des *templates*, doch wird die Spezifität der PCR hierdurch deutlich verbessert. In dieser Arbeit wurde die Anlagerungstemperatur zu Anfang 10°C höher als vorgesehen gewählt und dann kontinuierlich in 0,5°C Schritten in 20 Zyklen auf das eigentliche Primer-Optimum gesenkt. Die Primer, die in dieser Arbeit benutzt wurden, wurden so konzipiert, dass sie alle in dem gleichen Zyklus-Protokoll eingesetzt werden konnten:

	Zyklus	Denaturierung		Anlagerung		Elongation	
Aktivierung der Polymerase	0	95°C	120 s	-	-	-	-
Touch-down-PCR Zyklus 1-20:	1 – 20	95°C	1 s	68°C *	10 s	72°C	16 s
	21 – 40 -0,5°C pro Zyklus	95°C	1 s	58°C	10 s	72°C	16 s

2.8.6 *Real-time-PCR*

Die PCR wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um eine quantitative Aussage über die mRNA-Expression bestimmter Proteine treffen zu können. Eine Quantifizierung mittels konventioneller PCR ist jedoch nur möglich, solange sich die PCR-Reaktion im linearen Bereich der Amplifikationseffizienz befindet, d.h. es findet pro Zyklus eine Verdopplung des entsprechenden *templates* statt. In der Plateauphase der PCR-Reaktion lässt sich jedoch oft ein ursprünglicher Mengenunterschied der entsprechenden DNA-Matrize nicht mehr feststellen. Die Plateauphase wird bei jeder PCR-Reaktion unterschiedlich schnell erreicht und kann deshalb nur sehr schwer überprüft werden. Hierzu müsste man nach jedem PCR-Zyklus ein Aliquot aus der Reaktion entfernen und zur Quantifizierung auf ein Gel auftragen, ohne die Bedingungen der PCR-Reaktion zu beeinflussen. Diese Überprüfung entfällt jedoch, wenn die gebildete DNA-Menge während der PCR im Reaktionsansatz gemessen werden kann. Dies ist mit Hilfe der *real-time-PCR* möglich.

Der Begriff *real-time*-PCR bezieht sich auf ein kontinuierliches Monitoring des PCR-Produktes während der Reaktion. Dies geschieht über die Messung eines Fluoreszenzsignals, das während der PCR proportional zur Menge des entstehenden Amplifikats ansteigt. Die Erzeugung des Fluoreszenzsignals ist im SYBR-Green-Format, welches hier verwendet wurde, möglich. Das SYBR-Green I-Dye bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA. Durch diese Bindung steigt seine Fluoreszenz um ein Vielfaches an. Man misst also je nach Menge der doppelsträngigen DNA in der Glaskapillare ein unterschiedliches Signal (bei 530 nm Wellenlänge). Während der Denaturierungs- bzw. der Anlagerungsphase liegt kaum doppelsträngige DNA vor; man misst also nur sehr schwache Fluoreszenz. Am Ende der Elongationsphase liegt die meiste DNA in Doppelsträngen vor und die maximale Menge SYBR-Green ist gebunden. Dies entspricht dem maximalen Fluoreszenzsignal. Durch Messung der Fluoreszenz jeweils am Ende jeder Elongationsphase ist so die steigende Menge DNA von Zyklus zu Zyklus detektierbar. Mit geeigneten Referenzproben, deren Kopienzahl bekannt ist, lässt sich schließlich auf die ursprüngliche Kopienzahl in der zu untersuchenden Probe rück schließen. Um letztlich eine quantitative Aussage über die mRNA-Expression eines bestimmten Gens zu erhalten, wird die gemessene Kopienzahl auf die Transkriptzahl eines so genannte Referenzgens bezogen, welche in jeder Probe zusätzlich bestimmt wird. Das Referenzgen wird hierbei so gewählt, dass dessen Expression nicht durch den Versuchsansatz beeinflusst wird.

Da manche der TLR-Primer auch genomische DNA detektieren, wurde zusätzlich eine Qualitätskontrolle durchgeführt, um die Amplifikationseffizienz der Primerpaare zu vergleichen. Hierzu wurden jeweils 5 ng genomische DNA (entspricht ca. 1500 genomischen Kopien) als *template* eingesetzt und die Kopienzahl nach Amplifikation bestimmt. Die hierbei detektierte Kopienzahl lag mit 561 bis 1791 Transkripten nah an der zu erwartenden Zahl von 1500 Kopien. Zieht man in Betracht, dass es durch einen PCR-Zyklus zu einer ca. $16 * 10^6$ fachen Vervielfältigung eines *templates* kommt, so demonstrieren diese Werte die Genauigkeit der durchgeführten PCR. Ferner wurde, um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, von zufällig ausgewählten Proben eine "minus RT-Probe" angefertigt. Bei diesen Proben wurde der Umschrieb der mRNA in cDNA unterlassen und anschließend wurden sie als *template* in einer PCR-Reaktion eingesetzt. In keiner dieser Proben kam es zu einer Amplifikation des mutmaßlichen Zielgens, so dass eine Verunreinigung mit genomischer DNA ausge-

geschlossen werden konnte. Die Charakteristika der verwendeten Primer ist unter Absatz 2.3.1 angegeben. Jede Probe wurde in zwei unabhängigen Ansätzen gemessen und der entsprechende Mittelwert gebildet. Die Kopienzahlen der detektierten Zielgene wurden schließlich auf das Referenzgen Cyclophilin-B normalisiert und als Kopienzahlen pro 1000 Kopien Cyclophilin-B angegeben.

2.9 Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel und SEM (*standard error of mean* = Standardfehler des Mittels) angegeben. Falls in einem Versuchsansatz lediglich zwei unabhängige Experimente durchgeführt wurden, sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm Reichweite dargestellt. Dies ist jedoch explizit in der Beschreibung der Abbildung erwähnt. Bei einigen Experimenten wurde zum Vergleich der Mittelwerte ein zweiseitiger Student-t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$ angenommen und ist durch Markierung mit einem * bzw. ** angezeigt.

3. Ergebnisse

3.1 Die Interaktion von plasmazytoider dendritischer Zelle und B-Zelle

3.1.1 PDCs verstärken die Wirkung von CpG-Oligonukleotiden auf B-Zellen innerhalb von PBMCs

Erst kürzlich konnte eine neue Gruppe von CpG-Motiv-enthaltenen Sequenzen identifiziert werden, welche sowohl eine direkte Aktivierung von humanen B-Zellen als auch eine potente Sekretion von IFN- α durch Aktivierung der PDC ermöglicht¹⁵³. Es stellte sich daher die Frage, ob CpG-C-stimulierte PDCs in der Lage sind, humane B-Zellen innerhalb von PBMCs zu aktivieren. Um dies zu untersuchen, wurden PBMCs, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, isoliert und in einem zweiten Schritt die PDCs von den PBMCs mit dem BDCA-4 Kit depletiert. In der **Abbildung 3.1** ist ein FACS-Bild zusehen, in dem PDCs innerhalb von PBMC (50.000 Zellen pro FACS-Röhrchen) mit fluoreszierenden FACS-Antikörpern gegen die Oberflächenantigene BDCA-2 (Anti-BDCA-2 PE) und MHC-II (HLA-DR PerCP) angefärbt wurden. BDCA-2 ist ein spezifischer Marker der PDC⁶⁹ und konnte daher bedenkenlos zur Charakterisierung und Quantifizierung von PDCs eingesetzt werden. Vor Depletion der PDCs mittels BDCA-4-Kit ist ein Prozentsatz von 0,76% PDCs auszumachen, während nach Depletion dieser Prozentsatz auf 0,14% sinkt.

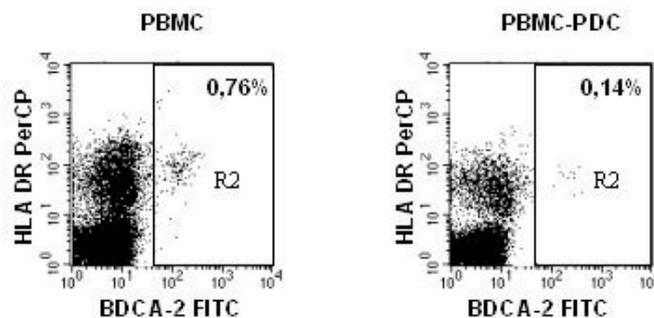


Abbildung 3.1 PDC-Depletion

PBMCs wurden aus *buffy coats* isoliert und in zwei Teile aufgesplittet
 Linkes Bild: Vor Depletion der PDCs erkennt man einen Prozentsatz von 0,76% PDCs.
 Rechtes Bild: Nach Depletion mittels BDCA-4-kit sinkt der Prozentsatz auf 0,14%.
 Ein repräsentativer Spender von n=3 ist gezeigt.

Darüber hinaus hatten vorherige Studien beim Menschen und der Maus belegt, dass eine simultane Stimulation von humanen B-Zellen mit CpG und eine gleichzeitige Stimulation über den B-Zell-Rezeptor (BCR) mittels Anti-Ig zu einer verstärkten Aktivierung von B-Zellen führt^{120, 173, 174}. Synthetisches Anti-Ig besteht aus einem Fab-Fragment, welches zu einer Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors auf humanen B-Zellen führt und somit einen Kontakt mit Antigen simuliert. Demzufolge wurden PBMCs und PBMCs, welche von PDCs depletiert wurden, in einer Konzentration von 1×10^6 PBMC/ml in einer 24-well-Platte (Bettvolumen: 0,5-1,0 ml) mit CpG-C (3 μ g/ml) und mit oder ohne Anti-Ig (10 μ g/ml) in RPMI-Medium (mit 10% Fötalem Kälberserum) inkubiert. Nach 72 h wurden die PBMCs geerntet und das kostimulatorische Molekül CD86 auf CD19⁺ humanen B-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert und als Mediane Fluoreszenz Intensität (MFI) quantifiziert.

In **Abbildung 3.1.1** kann man tatsächlich einen moderaten Synergismus zwischen Anti-Ig und CpG-C innerhalb von PBMCs feststellen. Dies führte in PBMCs zu einer höheren Expression von CD86 als durch die Stimulation mit CpG-C alleine. Viel wichtiger war jedoch die Beobachtung, dass die Depletion von PDCs die B-Zell-Aktivierung signifikant verringerte. In **Abbildung 3.1.1A** ist ein repräsentativer Spender von n=4 gezeigt. Den Mittelwert der drei Spender verdeutlicht **Abbildung 3.1.1B**.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die IL-6-Produktion in PBMC-Überständen beobachtet (nicht gezeigt). In diesem Falle konnte jedoch auf Grund der Vielzahl möglicher IL-6-Produzenten nicht exakt auf den Ursprung dieses Zytokins geschlossen werden. Daher wurden B-Zellen innerhalb von PBMCs intrazellulär auf IL-6-Produktion untersucht. 400.000 PBMCs wurden dazu für 4 h mit CpG-C und dann für 3 h mit Brefeldin A inkubiert. Danach wurden die PBMCs gewaschen und anhand des Protokolls des *Fix and Perm Kits* mit Anti-CD19 APC und Anti-IL-6 PE gefärbt.

Abbildung 3.1.1C zeigt, dass die Depletion von PDCs zu einer Verringerung der IL-6-Produktion in humanen B-Zellen führt.

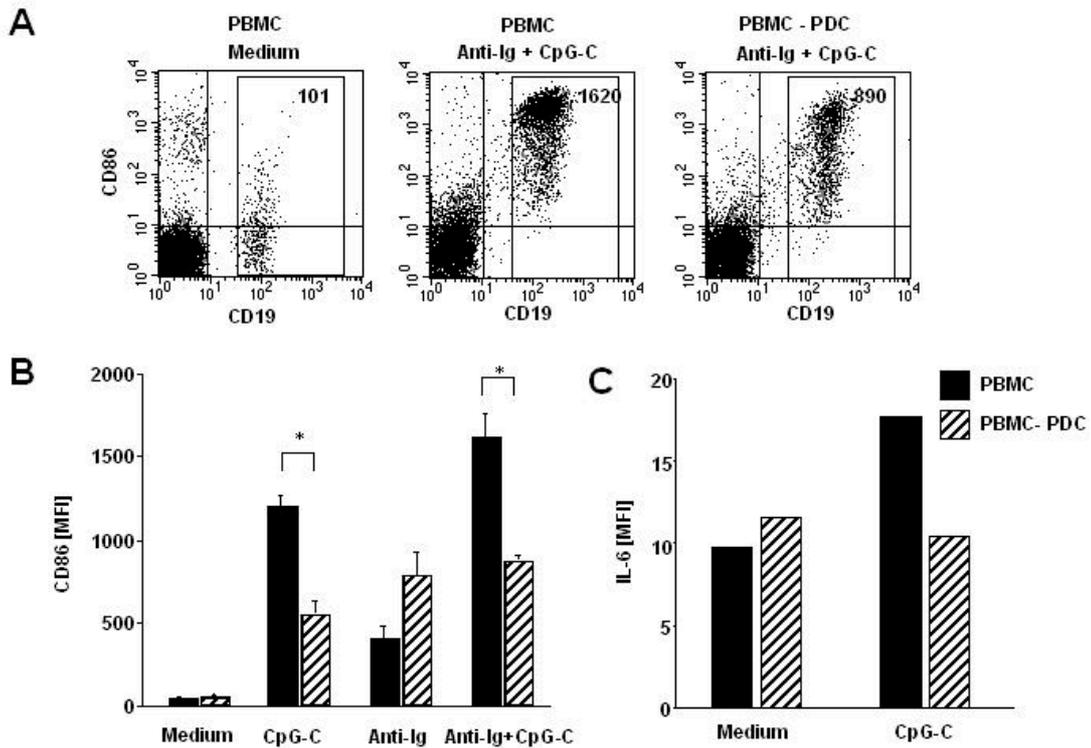


Abbildung 3.1.1 PDCs können B-Zellen innerhalb von PBMCs aktivieren

PBMCs (1×10^6 Zellen; schwarze Balken) oder PBMCs, die von PDCs depletiert wurden (1×10^6 Zellen; gestreifte Balken), wurden für 72 h mit CpG-C ($3 \mu\text{g/ml}$) und mit/ohne Anti-Ig ($10 \mu\text{g/ml}$) bei 37°C inkubiert. Nach 72 h wurden die PBMCs geerntet und das kostimulatorische Oberflächenmolekül CD86 auf CD19^+ humanen B-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert und als Mediane Fluoreszenz Intensität (MFI) quantifiziert. Für die intrazelluläre IL-6-Messung wurden 400.000 PBMCs für 4 h mit CpG-C und dann für 3 h mit Brefeldin A inkubiert. Später wurde die IL-6-Produktion der CD19^+ B-Zellen ausgewertet.

A: Herunterregulation von CD86 bei Depletierung von PDCs. Ein repräsentativer Spender von $n=4$ ist gezeigt.

B: CD86 auf PBMCs (schwarze Balken) und PBMCs ohne PDCs (gestreifte Balken). Die Mittelwerte und SEM von $n=4$ unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

C: Intrazelluläre IL-6-Produktion von CD19^+ B-Zellen (ein Spender).

3.1.2 PDCs fördern die CpG-ODN-induzierte CD86-Expression auf humanen B-Zellen

Die Beobachtung, dass PDCs innerhalb von PBMCs einen immunstimulatorischen Effekt auf B-Zellen haben, führte zu der Überlegung, ob PDCs das immunologische Verhalten der B-Zelle auch in reiner autologer Zellkultur beeinflussen. Um dies zu untersuchen wurden PBMCs aus *buffy coats* isoliert und nach Feststellen der Zellviabilität und der Zellzahl mittels Trypan-Blau in zwei Hälften aufgeteilt: Die erste Hälfte der PBMCs wurde benutzt, um plasmazytoide dendritische Zellen aus PBMCs nach dem

MACS-Prinzip zu isolieren. Hierzu wurde nach dem Protokoll von Miltenyi Biotech zur Isolation von plasmazytoiden dendritischen Zellen mit dem BDCA-4-Kit vorgegangen. Die zweite Hälfte der PBMCs wurde dazu verwendet, humane B-Zellen aus PBMCs mit dem CD19 B-Zell Isolationskit (ebenfalls nach dem MACS-Prinzip) zu isolieren. Die Reinheit von B-Zellen und PDCs wurde durchflusszytometrisch bestimmt und war stets, wie in **Abbildung 3.1.2A** gezeigt, über 95%.

Um nun herauszufinden, ob CpG-C stimulierte PDCs die B-Zell-Aktivierung auch in autologer Zellkultur unterstützen, wurden humane B-Zellen (1×10^5 Zellen) entweder alleine oder in Gegenwart von PDCs (1×10^4 Zellen) mit CpG-C ($3 \mu\text{g/ml}$) und mit oder ohne Anti-Ig ($10 \mu\text{g/ml}$) in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ in 96-Rundbodenwells bei 37°C inkubiert. Nach 72 h wurden die B-Zellen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von CD86 überprüft und wieder mittels MFI quantifiziert. Wir fanden heraus, dass im Vergleich mit reinen CpG-C-stimulierten B-Zellen die Zugabe von PDCs zu einer verstärkten Expression von CD86 auf humanen B-Zellen führt. Insbesondere wurde dieser Effekt beobachtet, wenn B-Zellen noch zusätzlich über ihren B-Zell-Rezeptor mittels Anti-Ig stimuliert wurden (**Abbildung 3.1.2B**).

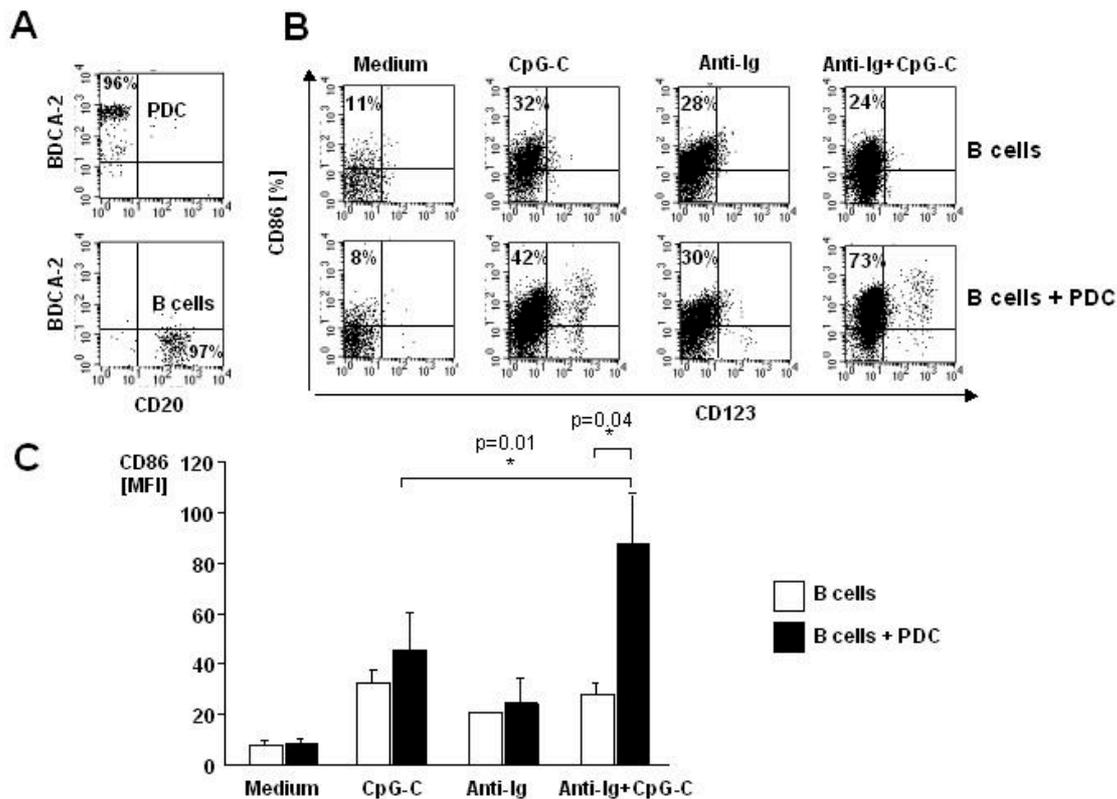


Abbildung 3.1.2 PDCs fördern die CD86-Expression auf humanen B-Zellen

Humane B-Zellen (1×10^5 Zellen) wurden entweder alleine oder in der Gegenwart von PDCs (1×10^4 Zellen) mit CpG-C ($3 \mu\text{g/ml}$) und mit oder ohne Anti-Ig ($10 \mu\text{g/ml}$) in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ in 96-Rundbodenwells bei 37°C inkubiert. Nach 72 h wurden die B-Zellen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von CD86 analysiert und mittels MFI quantifiziert. Die Mittelwerte und SEM von $n=5$ unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

A: Reinheit von B-Zellen (CD20) und PDCs (BDCA-2).

B: CD86-Expression auf B-Zellen: ein repräsentativer Spender von $n=5$ ist gezeigt.

C: CD86 auf B-Zellen (weiße Balken) und B-Zellen koinkubiert mit PDCs (schwarze Balken).

3.1.3 Die Anwesenheit von CpG-stimulierten PDCs führt zu einer erhöhten Zytokinproduktion von humanen B-Zellen

Die Depletion der PDCs und die autologe Zellkultur humaner B-Zellen mit PDCs hatten gezeigt, dass PDCs die CpG-induzierte Immunstimulation humaner B-Zellen weiter fördern können. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die verstärkte Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle humaner B-Zellen auch mit einer erhöhten Induktion von Zytokinen einhergehen könnte. Es interessierten vor allem Zytokine, die nach Beschreibungen in der Literatur die Plasmazelldifferenzierung von humanen B-Zellen fördern (IL-6 und IL-10¹⁷⁵) sowie der Entzündungsmediator TNF- α .

Um nun zu untersuchen, ob die Zytokinproduktion humaner B-Zellen durch PDCs gesteigert werden kann, wurden humane B-Zellen (1×10^5 Zellen) entweder alleine oder in der Gegenwart von PDCs (1×10^4 Zellen) mit CpG-C ($3 \mu\text{g/ml}$) und mit oder ohne Anti-Ig ($10 \mu\text{g/ml}$) in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ in 96-Rundbodenwells bei 37°C inkubiert. Nach 72 h wurde der Überstand abgenommen und nach dem Protokoll der verschiedenen ELISA (IL-6 ELISA; IL-10 ELISA; TNF- α ELISA) auf die gesuchten Zytokine untersucht.

Erstaunlicherweise konnte die CpG-induzierte IL-6-Produktion von B-Zellen vor allem gesteigert werden, wenn B-Zellen zusammen mit PDCs inkubiert worden waren (**Abbildung 3.1.3A**). B-Zellen, die nur mit CpG-C alleine inkubiert worden waren, zeigten eine weitaus geringere Produktion von IL-6. Zusätzlich zu der vermehrten Produktion von IL-6 in Gegenwart von CpG-stimulierten PDCs konnte man auch hier einen starken Synergismus zwischen Anti-Ig und CpG-C feststellen. Der Synergismus von Anti-Ig und CpG-C führte ebenso zu einer erheblichen Steigerung von TNF- α und IL-10 (**Abbildung 3.1.3B und Abbildung 3.1.3C**). Diese Steigerung konnte noch signifikant erhöht werden, wenn PDCs in der Zellkultur vorhanden waren.

Als nächstes musste jedoch ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Zytokinproduktion von B-Zellen nicht nur auf eine Überlagerung der Zytokinsekretion von B-Zellen und PDCs zurückzuführen war. Dazu wurden reine PDCs desselben Spenders (1×10^4 Zellen) mit CpG-C und Anti-Ig stimuliert und auch hier der Überstand auf die Zytokine (IL-6; IL-10; TNF- α) analysiert.

Wie man den **Abbildungen 3.1.3D-F** entnehmen kann, produzieren PDCs zu wenig Zytokine, als dass der fördernde Effekt in reiner Zellkultur nur durch eine Zytokinüberlagerung zustande kommen könnte. Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass die CpG-induzierte Zytokinproduktion humaner B-Zellen vor allem über eine gleichzeitige Stimulation des B-Zell-Rezeptors und durch die Anwesenheit der PDC gesteigert werden kann. Da in letzter Zeit insbesondere IFN- α immunmodulatorische Funktionen bezüglich B-Zell-Aktivierung nachgewiesen worden sind^{13, 34, 176, 177} und dessen Hauptproduzent im humanen System nach Virusinfektionen oder Stimulation mit CpG die PDC darstellt^{43, 72, 75}, interessierte vor allem die Menge des in den Zellkulturen produzierten IFN- α . Dieses wurde in den Überständen der Zellkulturen mittels eines

duzierten IFN- α . Dieses wurde in den Überständen der Zellkulturen mittels eines IFN- α ELISA gemessen.

Wie aus **Abbildung 3.1.3G** ersichtlich, produzieren CpG-stimulierte PDCs reichliche Mengen an IFN- α . Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass von der PDC produzierte lösliche Faktoren oder direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen B-Zellen und PDCs die vermehrte Sekretion von IL-6, TNF- α und IL-10 humaner B-Zellen bewirken.

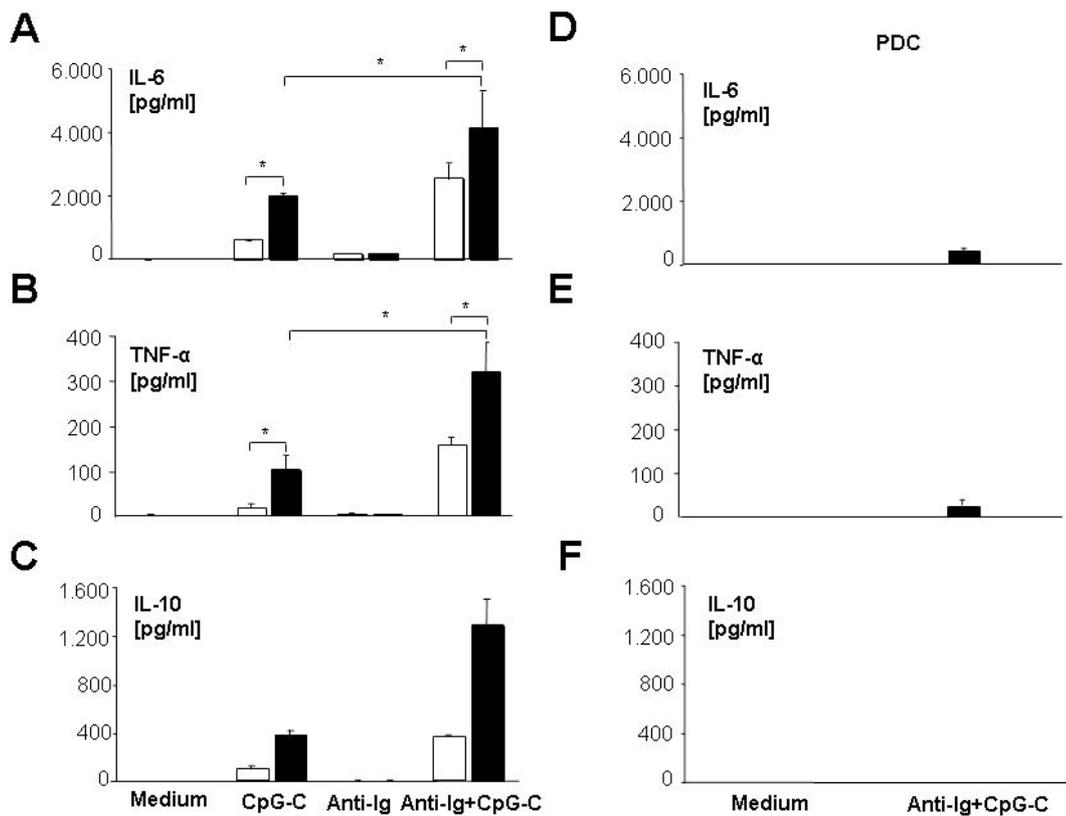


Abbildung 3.1.3 PDCs fördern die Zytokinsynthese humaner B-Zellen

Humane B-Zellen (1×10^5 Zellen) wurden entweder alleine oder bei Vorhandensein von PDCs (1×10^4 Zellen) mit CpG-C ($3 \mu\text{g/ml}$) und mit oder ohne Anti-Ig ($10 \mu\text{g/ml}$) in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ in 96-Rundbodenwells bei 37°C inkubiert. Nach 72 h wurde der Überstand abgenommen und nach dem Protokoll der verschiedenen ELISA (IFN- α ELISA; IL-6 ELISA; IL-10 ELISA; TNF- α ELISA) auf die gesuchten Zytokine untersucht. Die Mittelwerte und SEM von $n=4$ (IL-6, TNF- α) oder von $n=2$ (IL-10) unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

A: IL-6-Produktion in B-Zellen (weiße Balken) und B-Zellen koinkubiert mit PDCs (schwarze Balken).

B: TNF- α Produktion in B-Zellen (weiße Balken) und B-Zellen koinkubiert mit PDCs (schwarze Balken).

C: IL-10-Produktion in B-Zellen (weiße Balken) und B-Zellen koinkubiert mit PDCs (schwarze Balken).

D-F: PDCs (1×10^4 Zellen) wurden mit CpG-C ($3 \mu\text{g/ml}$) und mit oder ohne Anti-Ig ($10 \mu\text{g/ml}$) in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ in 96-Rundbodenwells bei 37°C inkubiert. Die Abbildungen zeigen die Zytokinproduktion von IL-6, IL-10 und TNF- α allein durch die PDCs an.

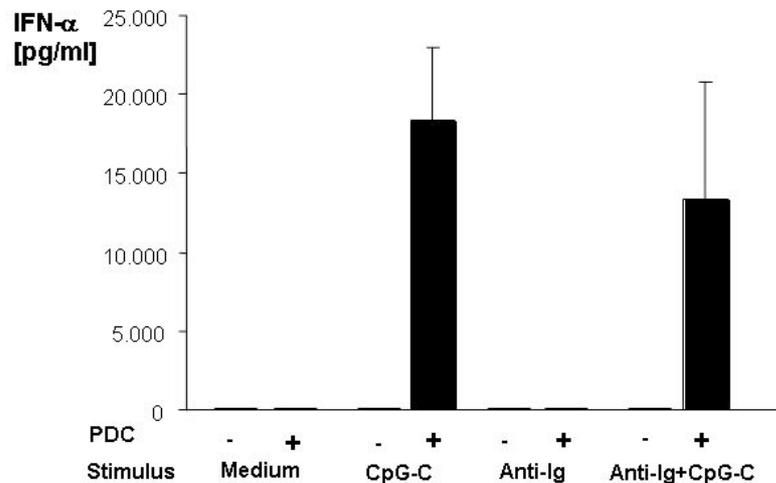


Abbildung 3.1.3G IFN- α -Produktion in PDCs

PDCs (1×10^4 Zellen; schwarze Balken) wurden mit CpG-C ($3 \mu\text{g/ml}$) und mit oder ohne Anti-Ig ($10 \mu\text{g/ml}$) in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ in 96-Rundbodenwells bei 37°C inkubiert. Die Mittelwerte und SEM von $n=3$ unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

3.1.4 Die Anwesenheit von CpG-stimulierten PDCs führt auch zu einer erhöhten Zytokinproduktion der naiven und memory B-Zellen

Die vorangegangenen Beobachtungen führten zu der Fragestellung, ob sich naive oder memory B-Zellen nach Stimulation mit CpG-C und gleichzeitiger Aktivierung des B-Zell-Rezeptors gleich verhalten und ob PDCs eine der beiden B-Zell-Populationen besonders fördern können. Dazu mussten B-Zellen in ihre Untergruppen, d.h. naive und memory B-Zellen, aufgetrennt werden. Es wurde bewiesen, dass unterschiedliche Expression von CD27 auf humanen B-Zellen ein gutes Mittel ist, diese in ihre Untergruppen aufzuteilen. So wird CD27 nur auf memory B-Zellen, nicht aber auf naiven B-Zellen exprimiert ¹⁶⁹.

Anhand dieses Prinzips wurden in einem ersten Schritt “unberührte” B-Lymphozyten mit dem B-Zell-Isolations-Kit (nach dem MACS-Prinzip) aus PBMCs (jeweils $n=3$)

isoliert. In einem zweiten Schritt konnten diese “unberührten B-Zellen” dann entsprechend dem Protokoll des Herstellers (siehe Material und Methoden) in naive und memory B-Zellen aufgetrennt werden. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. Die durchflusszytometrisch ermittelte Reinheit der auf diese Weise erhaltenen naiven CD27⁻ B-Zellen und der positiv selektierten CD27⁺ memory B-Zellen lag je nach Spender zwischen 70% und 100%.

Um nun die Zytokinproduktion humaner B-Zellen in Gegenwart von CpG-C stimulierten PDCs zu untersuchen, wurden naive und memory B-Zellen (1×10^5 Zellen) entweder alleine oder in Co-Kultur mit PDCs (1×10^4 Zellen) mit CpG-C (3 $\mu\text{g/ml}$) und mit oder ohne Anti-Ig (10 $\mu\text{g/ml}$) in einem Volumen von 200 μl in 96-Rundbodenwells bei 37°C inkubiert. Nach 72 h wurde der Überstand abgenommen und nach dem Protokoll der verschiedenen ELISA auf die gesuchten Zytokine untersucht.

Wie man in **Abbildung 3.1.4A** sieht, ist die CpG-C induzierte IL-6-Produktion vor allem in naiven B-Zellen gesteigert, die zusammen mit PDCs inkubiert worden waren und zusätzlich über ihren B-Zell-Rezeptor stimuliert wurden (**Abbildung 3.1.4A**). Naive B-Zellen, die nur mit CpG-C und Anti-Ig alleine inkubiert worden waren, zeigten eine weitaus geringere Produktion von IL-6. Bei memory B-Zellen war die CpG-induzierte IL-6-Produktion ebenfalls gesteigert, wenn sie über ihren B-Zell-Rezeptor stimuliert und PDCs in der Zellkultur vorhanden waren. Die IL-6-Anstiege waren in naiven B-Zellen jedoch quantitativ höher, so dass man sagen kann, dass naive B-Zellen den größeren Anteil der IL-6-Produktion übernehmen. Ähnliche Ergebnisse erhielt man sowohl für die TNF- α - als auch für die IL-10-Produktion (**Abbildung 3.1.4B und C**). Auch hier führte der Synergismus von Anti-Ig und CpG-C vor allem bei naiven B-Zellen zu einer erheblichen Steigerung von TNF- α und IL-10, während die Stimulation der memory B-Zellen zu einer geringeren TNF- α und IL-10-Sekretion führte.

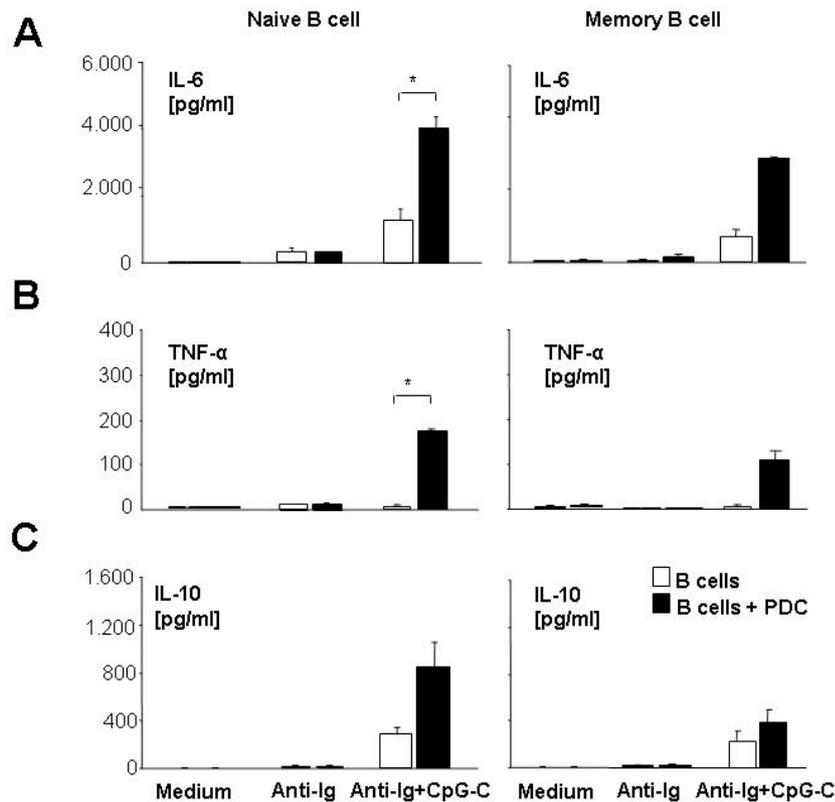


Abbildung 3.1.4 PDCs fördern die Zytokinsynthese von naiven und memory B-Zellen

Naive und memory B-Zellen (1×10^5 Zellen) wurden entweder alleine oder in Gegenwart von PDCs (1×10^4 Zellen) mit CpG-C ($3 \mu\text{g/ml}$) und mit oder ohne Anti-Ig ($10 \mu\text{g/ml}$) in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ in 96-Rundbodenwells bei 37°C inkubiert. Nach 72 h wurde der Überstand abgenommen und auf die gesuchten Zytokine untersucht. Die Mittelwerte und SEM von $n=4$ (IL-6, TNF- α) oder von $n=2$ (IL-10) unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

A: IL-6-Produktion in naiven und memory B-Zellen (weiße Balken) und B-Zellen koinkubiert mit PDCs (schwarze Balken).

B: TNF- α -Produktion in naiven und memory B-Zellen (weiße Balken) und B-Zellen koinkubiert mit PDCs (schwarze Balken).

C: IL-10-Produktion in naiven und memory B-Zellen (weiße Balken) und B-Zellen koinkubiert mit PDCs (schwarze Balken).

3.1.5 CpG-stimulierte PDCs fördern die Generierung von Plasmazellen

Auf Grund der bisherigen Beobachtungen stellte sich die Frage, ob CpG-C stimulierte PDCs sogar die Plasmazelldifferenzierung fördern können. Plasmazellen sind charakterisiert durch eine hohe Expression von CD38 und durch eine Abnahme der Expression von CD20¹⁷⁰⁻¹⁷². Dabei entsprach der Ansatz der Zellkultur den vorangegangenen Experimenten mit dem Unterschied, dass der beste Zeitpunkt, um Plasmazellen im FACS sichtbar zu machen, bei ca. acht Tagen (im folgenden Text: 8 d)^{97, 178} liegt. Daher wurden PDCs und B-Zellen für 8 d inkubiert und dann durchflusszytometrisch

den PDCs und B-Zellen für 8 d inkubiert und dann durchflusszytometrisch auf die Generierung von Plasmazellen hin untersucht. Dazu wurden die Zellen mit fluoreszierenden FACS-Antikörpern (Anti-CD20 PE und Anti-CD38 APC) markiert. Der Anteil der entstandenen Plasmazellen ist definiert als die Zunahme der CD20⁻ and CD38⁺ B-Zellen und ist in Prozent angegeben.

Wie man aus **Abbildung 3.1.5A** entnehmen kann, wurde eine maximale Zunahme an Plasmazellen beobachtet, wenn B-Zellen zusammen mit CpG-C, PDCs und Anti-Ig co-kultiviert wurden. Unter diesen Kulturbedingungen zeigten einige Spender bis zu 70% Plasmazelldifferenzierung. In **Abbildung 3.1.5B** ist ersichtlich, dass die Zugabe von CpG-C alleine zu den Zellkulturen von B-Zellen und PDC zu einem Anstieg von CD20⁻ CD38⁺ Plasmazellen (20%) führte. Allerdings war der Unterschied zu B-Zellen, die nur mit CpG-C stimuliert worden waren, minimal. Es wurde jedoch ein signifikant erhöhter Anteil von CD20⁻ CD38⁺ Plasmazellen generiert, wenn die B-Zellen zusätzlich über ihren B-Zell-Rezeptor mittels Anti-Ig aktiviert worden waren (55%). In den Zellkulturen ohne PDCs war kein signifikanter Anstieg von Plasmazellen durch CpG-C und B-Zell-Rezeptor-Stimulation vorhanden.

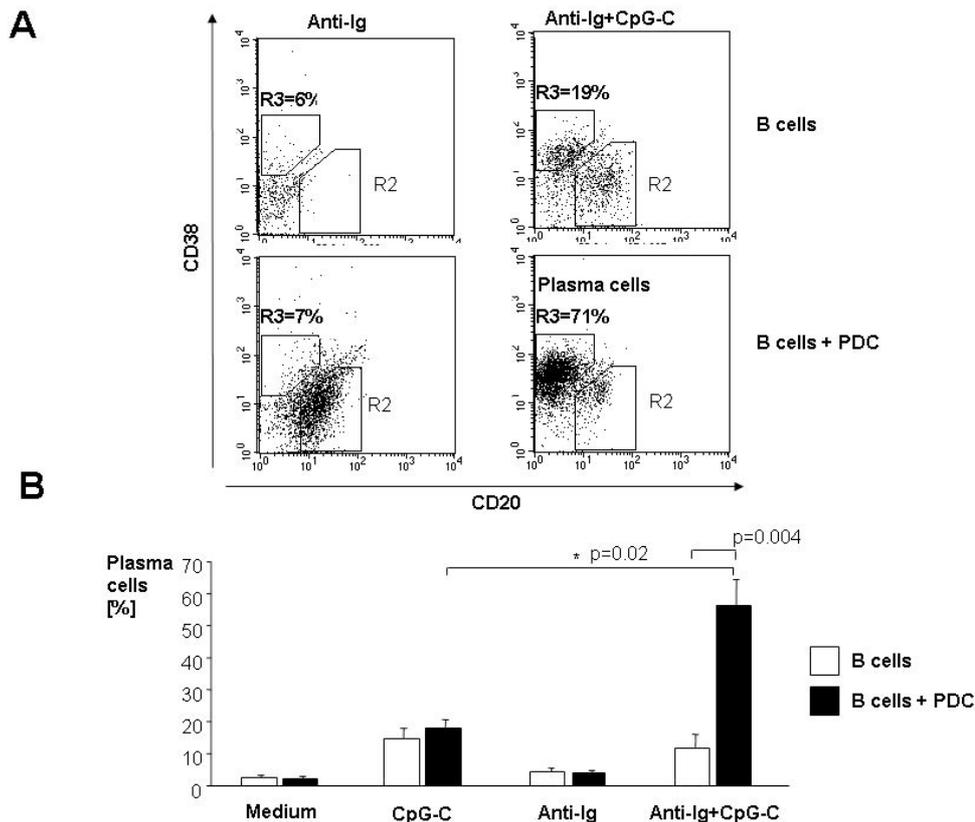


Abbildung 3.1.5 PDCs fördern die Generierung von Plasmazellen

Humane B-Zellen (1×10^5 Zellen) wurden entweder alleine oder in Gegenwart von PDCs (1×10^4 Zellen) mit CpG-C ($3 \mu\text{g/ml}$) und mit oder ohne Anti-Ig ($10 \mu\text{g/ml}$) in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ in 96-Rundbodenwells bei 37°C inkubiert. Nach 8 d wurden die B-Zellen durchflusszytometrisch auf die Generierung von Plasmazellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit fluoreszierenden FACS-Antikörpern (Anti-CD20 PE und Anti-CD38 APC) markiert. Der Anteil der entstandenen Plasmazellen ist definiert als die Zunahme der $\text{CD}20^-$ and $\text{CD}38^+$ B-Zellen und ist in Prozent angegeben.

A: Ein repräsentativer Spender ist gezeigt. Obere Reihe B-Zellen alleine und untere Reihen B-Zellen in Co-Kultur mit PDCs. Der prozentuale Anteil der Plasmazellen steht im oberen linken Quadranten.

B: Die Mittelwerte und SEM von $n=5$ unabhängigen Plasmazell-Experimenten sind gezeigt; B-Zellen (weiße Balken), B-Zellen und PDCs (schwarze Balken).

3.1.6 CpG und PDCs fördern die Generierung von Plasmazellen insbesondere aus Anti-Ig-stimulierten memory B-Zellen

Die außerordentliche Beobachtung, dass Antigen- (durch Anti-Ig) und CpG-C-stimulierte humane B-Zellen in Gegenwart von PDCs zu Plasmazellen ausdifferenzieren können, führte zu der Überlegung, welche B-Zell-Subpopulation für diesen Effekt verantwortlich ist. Analog zu obiger Vorgehensweise (**siehe Abschnitt 3.4**) wurden naive und memory B-Zellen isoliert (von $n=3$ Spendern), in Zellkultur gegeben und nach 8 d durchflusszytometrisch auf die Generation von Plasmazellen untersucht.

Zur weiteren Charakterisierung der Plasmazelle wurden die B-Zellen mit fluoreszierendem Anti-HLA-DR PerCP markiert.

Wie in **Abbildung 3.1.6A** zu sehen, führte die Zugabe von CpG-C und Anti-Ig zu den Zellkulturen von naiven B-Zellen und PDCs tatsächlich zu einem Anstieg der CD20⁻ CD38⁺ Plasmazellen (von 2% auf 18%). Der Unterschied zu naiven B-Zellen, die nur mit CpG-C und Anti-Ig stimuliert worden waren, war daher beträchtlich. Die Stimulation mit Anti-Ig alleine konnte weder in den Zellkulturen mit PDCs noch bei B-Zellen alleine zu einer Zunahme der Plasmazelldifferenzierung führen. Die CD38⁺ CD20⁻ Plasmazellen wiesen eine geringere HLA-DR-Expression auf als CD20⁺ CD38⁻ positive naive B-Zellen. Ein signifikant erhöhter Anteil von CD20⁻ CD38⁺ Plasmazellen wurde beobachtet, wenn memory B-Zellen durch CpG-C und ihren B-Zell-Rezeptor aktiviert wurden und PDCs in der Zellkultur vorhanden waren (von 6% auf 42%) (**Abbildung 3.1.6B**). Die CD38⁺ CD20⁻ positiven Zellpopulationen wurden ebenfalls auf ihre HLA-DR-Expression untersucht und auch hier zeigte sich, dass die CD38⁺ CD20⁻ positiven Plasmazellen eine geringere HLA-DR-Expression aufweisen als CD20⁺ CD38⁻ positive memory B-Zellen.

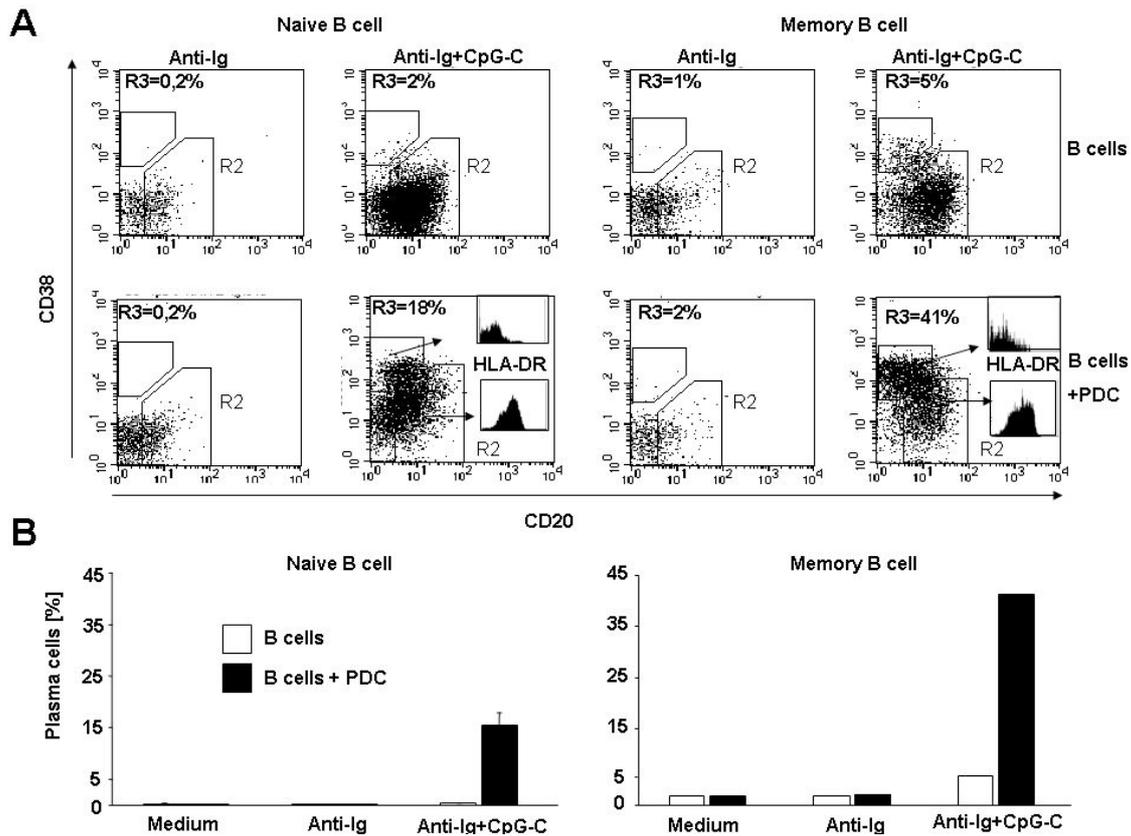


Abbildung 3.1.6 PDCs fördern die Generierung von Plasmazellen insbesondere aus Anti-Ig-stimulierten memory B-Zellen

Naive und memory B-Zellen (1×10^5 Zellen) wurden entweder alleine oder in Gegenwart von PDCs (1×10^4 Zellen) mit CpG-C ($3 \mu\text{g/ml}$) und mit oder ohne Anti-Ig ($10 \mu\text{g/ml}$) stimuliert.

A: Nach 8 d wurde der Anteil der $\text{CD20}^- \text{CD38}^+$ Plasmazellen und deren MHC-II-Expression durchflusszytometrisch untersucht. Der Anteil der Plasmazellen (Gate R3) wird im linken oberen Quadranten angezeigt (links naive B-Zellen, rechts memory B-Zellen; obere Reihe B-Zellen alleine, untere Reihe B-Zellen und PDCs). Ein repräsentativer Spender ist gezeigt.

B: Die Mittelwerte und SEM der Plasmazellendifferenzierung sind hier dargestellt (Mittelwerte von $n=2$ unabhängigen Experimenten (naive B-Zellen) und memory B-Zellen mit einem Experiment); B-Zellen (weiße Balken), B-Zellen und PDCs (schwarze Balken).

3.1.7 CpG-stimulierte PDCs unterstützen die Immunglobulinproduktion humaner B-Zellen

Frühere Studien konnten zeigen, dass DCs fähig sind, naive B-Zellen auf ihrem Weg zu Immunglobulin-produzierenden Zellen zu unterstützen¹⁷⁹. Daher stellte sich hier die Frage, ob die Kombination von CpG-C und Anti-Ig sowie die Anwesenheit der PDC die Immunglobulinproduktion unterstützen könnte. Um dieser Fragestellung weiter nachzugehen, wurden in Analogie zu obigen Experimenten B-Zellen und PDCs isoliert und in Zellkultur gegeben. Auf Grund vielversprechender Ergebnisse anderer Arbeits-

gruppen^{78, 170, 178, 179} wurde ein fester Zeitraum der Zellkultur von 13 d eingehalten. Nach 13 d wurde der Überstand abgenommen und nach dem Protokoll des Immunglobulin ELISA (IgM/IgG ELISA KIT) auf die gesuchten Immunglobuline (IgM und IgG) untersucht.

Wie in der **Abbildung 3.1.7A** zu sehen, produzieren B-Zellen, die nur über ihren B-Zell-Rezeptor aktiviert wurden, überhaupt kein IgM oder IgG. Ferner konnte eine nicht signifikante Zunahme der IgM-Synthese beobachtet werden, wenn PDCs in der Zellkultur vorhanden waren. Dieser Effekt war noch deutlicher, wenn B-Zellen mit Anti-Ig und CpG-C inkubiert worden waren (**Abbildung 3.1.7A**). Bezüglich der IgG-Synthese konnte man beobachten, dass B-Zellen, die durch ihren B-Zell-Rezeptor, CpG-C und in Gegenwart von PDCs stimuliert worden waren, eine beeindruckende Steigerung der IgG-Produktion erreichten. B-Zellen, die nur mit CpG-C und Anti-Ig stimuliert waren, zeigten eine weitaus geringere IgG-Synthese.

Um zu untersuchen, ob die gesteigerte Immunglobulinproduktion von B-Zellen in der Gegenwart von PDCs auf einen direkten Zellkontakt zurückzuführen war, wurden Experimente in einem Transwell-System durchgeführt, in dem die untere Zellkammer von der oberen durch eine 0,2 µm *Anapore*-Membran getrennt ist. Durch die 0,2 µm-Membran ist ein Austausch löslicher Faktoren möglich, nicht jedoch direkter Zell-Zell-Kontakt. Isolierte B-Zellen (500.000 CD19⁺CD20⁺ Zellen in 500 µl RPMI-Medium) wurden in die untere Kammer pipettiert, während isolierte PDCs (50.000 PDCs in 500 µl RPMI-Medium) in die obere Kammer gegeben wurden. Die Stimulation der B-Zellen erfolgte durch Pipettierung von Anti-Ig (10 µg/ml) und CpG-C (3 µg/ml) in das untere Transwell.

Wie in **Abbildung 3.1.7B** zu sehen ist, konnten keine Hinweise für direkten Zell-Zell-Kontakt festgestellt werden, da es zu keiner Änderung der Immunglobulinsynthese kam, wenn PDCs und B-Zellen in unterschiedlichen Kompartimenten kultiviert wurden. Folglich verstärken CpG-C-induzierte lösliche Faktoren (IL-10, IL-6, IFN- α) die Anti-gen-abhängige Immunglobulinproduktion von B-Zellen. Im nächsten Schritt wurden nun naive und memory B-Zellen aus PBMCs isoliert und in bekannter Konzentration in Kultur gegeben. Nach 13 d wurde der Überstand abgenommen und auf IgM und IgG untersucht.

Wie man aus **Abbildung 3.1.7C** entnehmen kann, gingen die Co-kulturen von naiven B-Zellen und PDCs mit hohen IgM-Werten einher. Die IgG-Synthese war größtenteils auf die Zellkulturen von memory B-Zellen mit PDCs beschränkt.

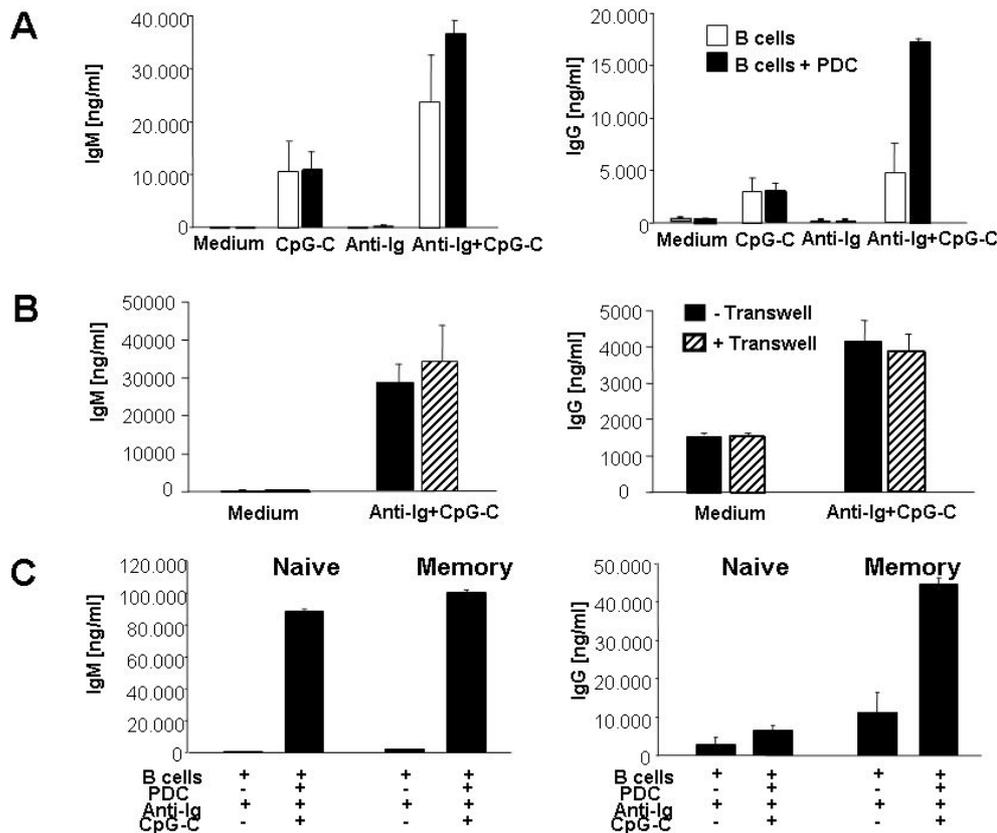


Abbildung 3.1.7 PDCs fördern die Immunglobulinproduktion humaner B-Zellen

Nicht aufgetrennte und aufgetrennte humane naive und memory B-Zellen (1×10^5 Zellen) wurden entweder alleine oder in Gegenwart von PDCs (1×10^4 Zellen) mit CpG-C ($3 \mu\text{g/ml}$) und mit oder ohne Anti-Ig ($10 \mu\text{g/ml}$) für 13 d stimuliert.

A: Im Überstand von nicht aufgetrennten humanen B-Zellen wurde nach 13 d IgM (linkes Bild) und IgG (rechtes Bild) mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte und SEM von $n=3$ unabhängigen Experimenten sind gezeigt; B-Zellen (weiße Balken), B-Zellen und PDCs (schwarze Balken).

B: Ein Transwellssystem wurde genutzt, um B-Zellen und PDCs zu trennen. B-Zellen und PDCs wurden ohne (schwarze Balken) und mit (gestreifte Balken) Transwell in Zellkultur gegeben. Isolierte B-Zellen ($500.000 \text{ CD19}^+ \text{ CD20}^+$ Zellen in $500 \mu\text{l}$ RPMI-Medium) wurden in die untere Kammer pipettiert, während isolierte PDCs (50.000 PDCs in $500 \mu\text{l}$ RPMI-Medium) in die obere Kammer gegeben wurden; nach 13 d Messung von IgM und IgG. Die Mittelwerte und SEM von $n=3$ unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

C: Nach 13 d wurden IgM und IgG in den Überständen von naiven und memory B-Zellen mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte und SEM von $n=3$ unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

3.2 Die Suche nach dem Mechanismus

3.2.1 Die Aktivierung von B-Zellen durch CpG-stimulierte PDCs kommt durch lösliche Faktoren zustande

Als nächstes war es wichtig aufzuklären, welcher Mechanismus hinter den beobachteten Ergebnissen stecken könnte. Es galt also herauszufinden, ob diese gesteigerte Aktivie-

rung von humanen B-Zellen nur auf lösliche Faktoren oder auf direkten Zell-Zell-Kontakt zurückzuführen war. Bezüglich der Immunglobulinproduktion schienen, wie in Abschnitt 3.1.7 dargestellt, lösliche Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen, nicht jedoch ein direkter Zell-Zell-Kontakt. Trotzdem limitierte die geringe Anzahl an PDCs, die nach der Zellisolation gewonnen wurde die Experimente, die dafür gedacht waren, den Mechanismus der B-Zell-Aktivierung zu erklären. Als Alternative wurde die Kombination von Stimulatoren ausgewählt, die sich bezüglich der B-Zell-PDC- Interaktion besonders herauskristallisiert hatten. Deshalb wurde hier die Kombination von Anti-Ig und CpG-C für die Expression der kostimulatorischen Oberflächenmarker, der Zytokine und der Plasmazelldifferenzierung ausgewählt. In Analogie zu obigem Experiment wurden B-Zellen und PDCs in einem Transwell-Kultursystem stimuliert.

In **Abbildung 3.2.1A** kann man sehen, dass die Zugabe von PDCs in das gleiche Kompartiment zu einer starken Stimulation (CD86) von B-Zellen führte. In der Zellkultur, in der B-Zellen von PDCs durch das Transwellssystem getrennt waren, kam es zu einer leichten, aber signifikanten Abnahme der B-Zell-Aktivierung. Ähnliche Ergebnisse konnten sowohl für die IL-6- und die IL-10-Produktion (**Abbildungen 3.2.1B und C**) als auch für die Plasmazelldifferenzierung (**Abbildung 3.2.1D**) beobachtet werden. Der **Abbildung 3.2.1D** kann man entnehmen, dass es durch das Transwell-System zu einem Abfall der CD20⁻ CD38⁺ Plasmazellen kam. Diese Beobachtung war jedoch nicht signifikant. Der signifikante Abfall der CD86-Expression wie auch der IL-6- und IL-10-Produktion war jedoch nicht eindeutig überzeugend und führte zu dem Schluss, dass die starke Fähigkeit von PDCs, B-Zellen zu aktivieren, größtenteils auf lösliche Faktoren zurückzuführen ist.

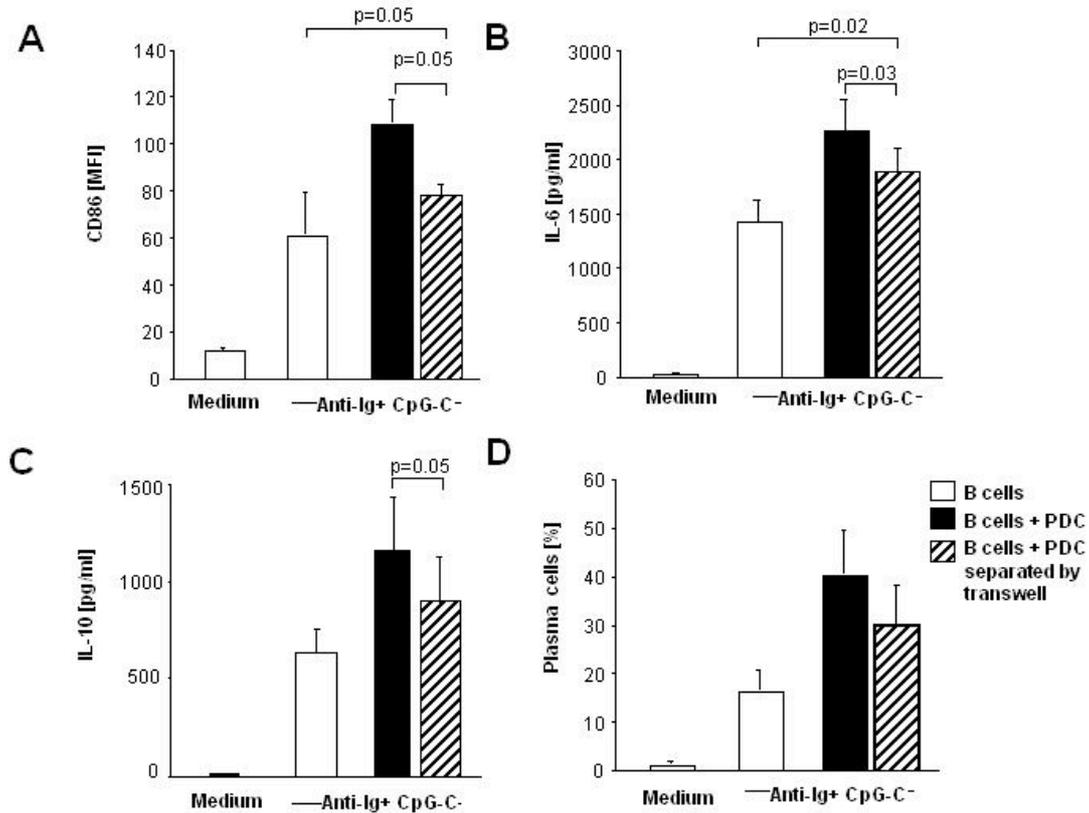


Abbildung 3.2.1 Die Aktivierung von B-Zellen kommt durch lösliche Faktoren zustande

B-Zellen und PDCs wurden ohne (schwarze Balken) und mit (gestreifte Balken) Transwell in Zellkultur gegeben. Dabei wurden isolierte B-Zellen (500.000 CD19⁺CD20⁺Zellen in 500 μ l RPMI-Medium) in die untere Kammer gegeben, während isolierte PDCs (50.000 PDC in 500 μ l RPMI-Medium) in die obere Kammer gegeben wurden. Weiße Balken stellen Kulturen mit B-Zellen alleine dar. Die Zellen wurden mit CpG-C (3 μ g/ml) und Anti-Ig (10 μ g/ml) stimuliert. Nach 3 d wurde der MFI von CD86 (A) analysiert und die Zytokine IL-6 (B) und IL-10 (C) in den Überständen mittels ELISA gemessen. Nach 8 d wurde der Anteil der CD20⁺CD38⁺ Plasmazellen durchflusszytometrisch untersucht (D). Die Mittelwerte und SEM von n=3 unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

3.2.2 IFN- α induziert eine erhöhte Produktion von IL-6, TNF- α und IgM humaner B-Zellen

Da nun mittels der Transwell-Experimente geklärt war, dass die starke Fähigkeit von PDCs, B-Zellen zu aktivieren, größtenteils auf lösliche Faktoren zurückzuführen und IFN- α der wahrscheinlichste Mediator dieser Immunstimulation war, galt es herauszufinden, ob rekombinantes IFN- α auf B-Zellen einen immunstimulatorischen Effekt hat. Daher interessierte vor allem, ob sich die Zytokine und Immunglobuline durch IFN- α beeinflussen lassen. Dazu wurden humane B-Lymphozyten aus PBMCs isoliert. Desweiteren wurden die B-Zellen (200.000/well) mit Anti-Ig (10 μ g/ml)

und CpG-ODN 2006 (3 µg/ml) in einem Volumen von 200 µl in 96-Rundbodenwells bei 37°C für 3 d und 13 d inkubiert. ODN 2006 ist der Prototyp von CpG-B-ODN, das ursprünglich auf Grund seiner Eigenschaft, B-Zell zu stimulieren, entwickelt worden war^{122, 123}. ODN 2006 ist ein schwacher IFN-α Induktor im Gegensatz zu CpG-C-ODN¹⁵³. Es eignete sich damit zur Überprüfung der Effekte mittels rekombinanten IFN-α. Die Effekte von IFN-α sind konzentrationsabhängig. Daher wurden unterschiedliche Konzentrationen IFN-α von 500 U/ml bis 6000 U/ml zu den Zellkulturen hinzugegeben, um die optimale IFN-α-Konzentration herauszufinden. Nach 3 d und 13 d wurden in den Überständen IL-6, TNF-α, IL-10, IgM und IgG mit dem jeweiligen ELISA gemessen.

Wie den **Abbildungen 3.2.2 A-C** zu entnehmen ist, produzieren B-Zellen sehr wenig IL-6, TNF-α und IL-10 nach Stimulation mit Anti-Ig oder CpG-B alleine. Wenn die B-Zellen jedoch mit Anti-Ig und CpG-B stimuliert wurden, konnte man eine signifikante Induktion von IL-6, TNF-α und IL-10 beobachten. Zusätzlich ließ sich dieser Synergismus bei IL-6 und TNF-α durch unterschiedliche Mengen IFN-α noch weiter fördern, während sich IL-10 von IFN-α zwar signifikant, aber nur leicht steigern ließ.

Abbildung 3.2.2D zeigt, dass auch die Produktion von IgM durch IFN-α beeinflussbar war (vor allem bei einer Konzentration von 1500 U/ml). Auch hier war ein Synergismus zwischen Anti-Ig und CpG-B zu beobachten, der in einer weitaus höheren IgM-Sekretion resultierte als bei B-Zellen, die nur mit CpG-B stimuliert worden waren. Die Steuerbarkeit der IgG-Produktion (Daten nicht gezeigt) auf humanen B-Zellen durch IFN-α erwies sich als Überraschung: Auch hier sieht man wieder einen Synergismus zwischen Anti-Ig und CpG-B, der in einer weitaus höheren IgG-Sekretion resultierte als bei B-Zellen, die nur mit CpG-B stimuliert worden waren. Anders als erwartet hatte IFN-α hier allerdings einen hemmenden Effekt auf die IgG-Produktion von B-Zellen, der umso stärker wurde, je höher die Menge an eingesetztem IFN-α war.

Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass PDCs die Synthese von IL-6, TNF-α und IgM durch IFN-α fördern können, während die IL-10-Produktion von IFN-α unabhängig bzw nur leicht beeinflussbar ist und die IgG-Synthese von B-Zellen sogar durch IFN-α verringert werden kann. Eine Kombination von blockierenden Antikörpern gegen Typ I Interferon in den Zellkulturen von PDCs und B-Zellen zeigte darüber hinaus

keine signifikante Abnahme der B-Zell-Aktivierung und bestätigte die Vermutung, dass die gesteigerte B-Zell-Aktivierung nicht exklusiv auf IFN- α zurückzuführen ist (**Abbildung 3.2.2.1**). Hierzu wurden humane B-Zellen (1×10^5 Zellen) entweder alleine oder in Gegenwart von PDCs (1×10^4 Zellen) mit CpG-C ($3 \mu\text{g/ml}$) und mit oder ohne Anti-Ig ($10 \mu\text{g/ml}$) in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ in 96-Rundbodenwells bei 37°C für 3 d inkubiert. Die biologische Aktivität von Typ I IFN (IFN- α und IFN- β) wurde geblockt durch eine Kombination von Anti-IFN- α (5000 neutralisierende U/ml), Anti-IFN- β (2000 neutralisierende U/ml) und Anti-IFN α/β Rezeptorantikörpern ($20 \mu\text{g/ml}$). Nach 3 d wurde der Überstand abgenommen und mittels ELISA auf die Zytokine IL-6 und IL-10 untersucht. Nach 8 d wurden die B-Zellen auf Plasmazelldifferenzierung analysiert.

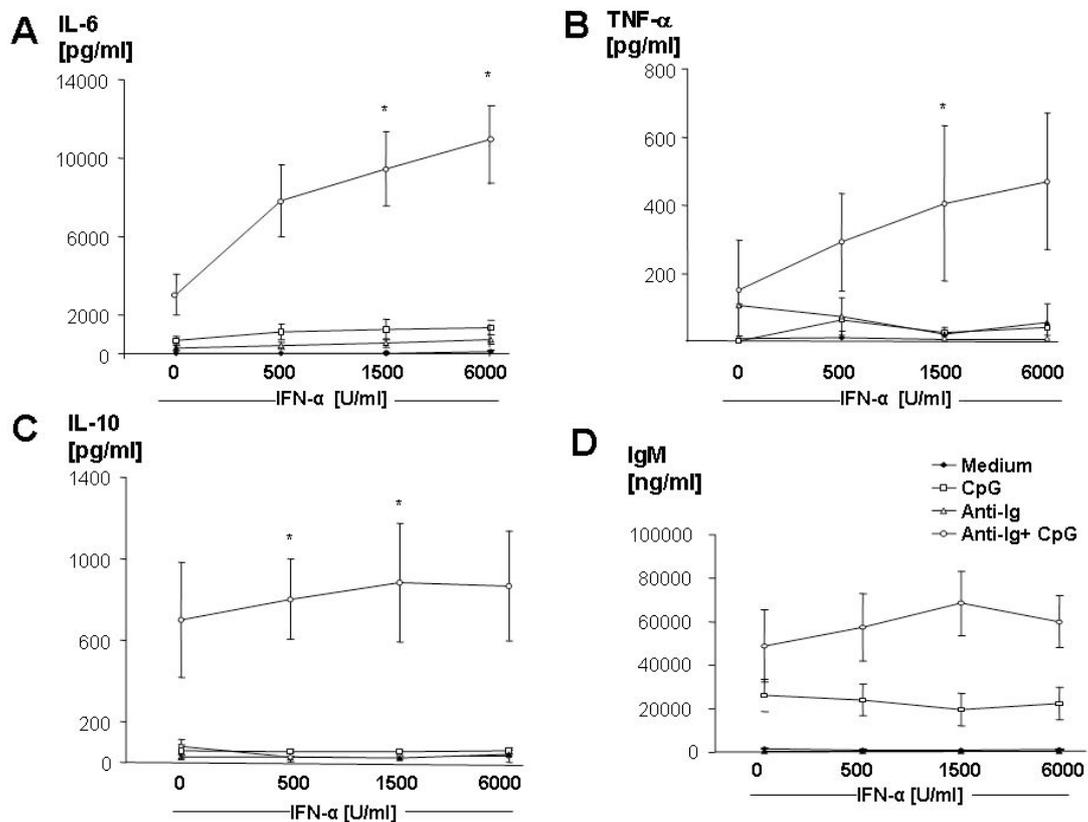


Abbildung 3.2.2 IFN- α fördert die Zytokin- und Immunglobulinsekretion

Humane B-Lymphozyten wurden aus PBMCs mit dem CD19 B-Zell-Isolations-Kit (nach dem MACS-Prinzip) isoliert. Die Reinheit von B-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und war stets über 95%. Desweiteren wurden die B-Zellen (200.000/well) durch ihren B-Zell-Rezeptor mit Anti-Ig ($10 \mu\text{g/ml}$), CpG-B-ODN 2006 ($3 \mu\text{g/ml}$) und ansteigenden Konzentrationen von rekombinanten IFN- α (500, 1500 und 6000 U/ml) in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ in 96-Rundbodenwells bei 37°C für 3 d und 13 d inkubiert. Nach 72 h wurde IL-6 (A), TNF- α (B) und IL-10 (C) in den Überständen mittels ELISA gemessen. Nach 13 d wurde IgM (D) in den Überständen gemessen. Die Mittelwerte und SEM von $n=4$ unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

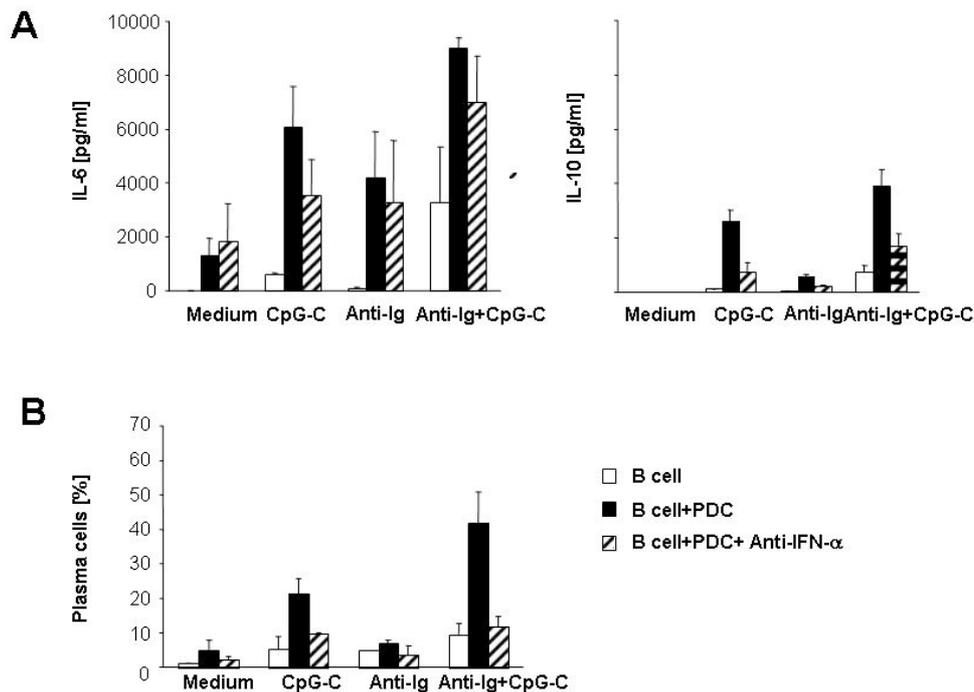


Abbildung 3.2.2.1 Blockierende Antikörper gegen Typ I Interferon in den Co-Kulturen von PDCs und B-Zellen zeigen eine Abnahme der B-Zell-Aktivierung

Hierzu wurden humane B-Zellen (weiße Balken) (1×10^5 Zellen) entweder alleine oder in der Gegenwart von PDCs (schwarze Balken) (1×10^4 Zellen) mit CpG-C ($3 \mu\text{g/ml}$) und mit oder ohne Anti-Ig ($10 \mu\text{g/ml}$) in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ in 96-Rundbodenwells bei 37°C für 3 d inkubiert. Die biologische Aktivität des Typ I IFN (IFN- α und IFN- β) wurde geblockt (gestrichelte Balken) durch eine Kombination von Anti-IFN- α (5000 neutralisierende U/ml), Anti-IFN- β (2000 neutralisierende U/ml) und Anti-IFN α/β Rezeptorantikörpern ($20 \mu\text{g/ml}$). Nach 3 d wurde der Überstand abgenommen und mittels ELISA auf die gesuchten Zytokine IL-6 und IL-10 (A) untersucht. Nach 8 d wurden die B-Zellen auf Plasmazelldifferenzierung (B) analysiert. Die Mittelwerte und SEM von $n=3$ unabhängigen Experimenten sind hier dargestellt.

3.2.3 Die Expression von TLR7 und TLR9 wird durch IFN- α beeinflusst

Die Erkennung von CpG-Motiven als molekulares Muster einer mikrobiellen Infektion erfolgt im Vertebraten-Immunsystem über Toll-Like-Rezeptor 9 (TLR9). Die einzigen Zellen, die im humanen System TLR9 exprimieren, sind B-Zellen und PDCs.

Desweiteren wurde schon beschrieben, dass mikrobielle Stimuli wie z.B. CpG-Oligonukleotide die Expression von TLRs regulieren können^{120, 180, 181} und somit zur Aktivierung von B-Zellen beitragen können. Da jedoch CpG-stimulierte PDCs die

Hauptproduzenten von IFN- α sind, stellte sich nun die Frage, ob dieser Botenstoff in der Lage ist, das TLR-Profil von humanen B-Zellen so zu verändern, dass eine verstärkte Aktivierung von humanen B-Zellen durch eine Aufregulation insbesondere von TLR9 möglich ist. Deshalb wurde die TLR9 mRNA-Expression von B-Zellen mit Hilfe der *real-time*-PCR analysiert. Als Kontrolle für die IFN- α Effekte wurde TLR7 mitbestimmt.

Dazu wurden die B-Zellen wieder aus PBMC mit Hilfe des CD19 Isolationskit isoliert und danach für 12 h ⁷ in Kultur gegeben (1×10^6 /ml in 24-well Platten). Die B-Zellen wurden mit Anti-Ig (10 μ g/ml), CpG-B (3 μ g/ml) und IFN- α (1000 U/ml) stimuliert.

Wie den **Abbildungen 3.2.3** zu entnehmen ist, nahm die Expression der mRNA von TLR9 und TLR7 in B-Zellen im Vergleich zum Kontrollmedium nach 12 h Kultur sowohl durch die Kombination von CpG-B und Anti-Ig als auch durch CpG-B alleine signifikant ab (**Abbildungen 3.2.3A und B**). Ein fast vollständiger Verlust der TLR9-Expression erfolgte, wenn B-Zellen mit Anti-Ig und CpG-B kostimuliert worden waren. IFN- α hatte keinen Effekt hinsichtlich einer Hochregulation von TLR9, sondern wirkte eher supprimierend. Im Gegensatz dazu stand die Expression von TLR7 (**Abbildung 3.2.3B**), welche durch die Stimulation mit IFN- α erhöht werden konnte. Jedoch führte die Stimulation mit Anti-Ig und/oder CpG-B ebenfalls zu einer Abnahme der TLR7-Expression. Die Feststellung, dass IFN- α einen Effekt auf die mRNA-Expression bestimmter TLRs in B-Zellen zu haben schien, führte zu dem nächsten Schritt, B-Zellen mit unterschiedlichen Mengen IFN- α zu stimulieren. B-Zellen wurden dazu mit 500 U/ml, 2500 U/ml und 5000 U/ml für 12 h inkubiert und dann die mRNA-Expression der TLRs mit der *real-time*-PCR bestimmt.

Die **Abbildungen 3.2.3C und D** zeigen, dass die mRNA-Expression von TLR9 herunterreguliert wird, wenn B-Zellen mit unterschiedlichen Mengen IFN- α stimuliert werden. Interessanterweise wurde auch in diesem Experiment die mRNA-Expression von TLR7 durch IFN- α erhöht. Mit diesen Ergebnissen konnte man also ausschließen, dass die verstärkte Fähigkeit von PDCs, B-Zellen zu aktivieren, auf eine Hochregulation von TLR9 zurückzuführen war, denn sowohl IFN- α als auch mikrobielle Stimuli wie CpG-B führten entgegen anderer Behauptungen ¹²⁰ zu einer Verringerung vor allem von TLR9.

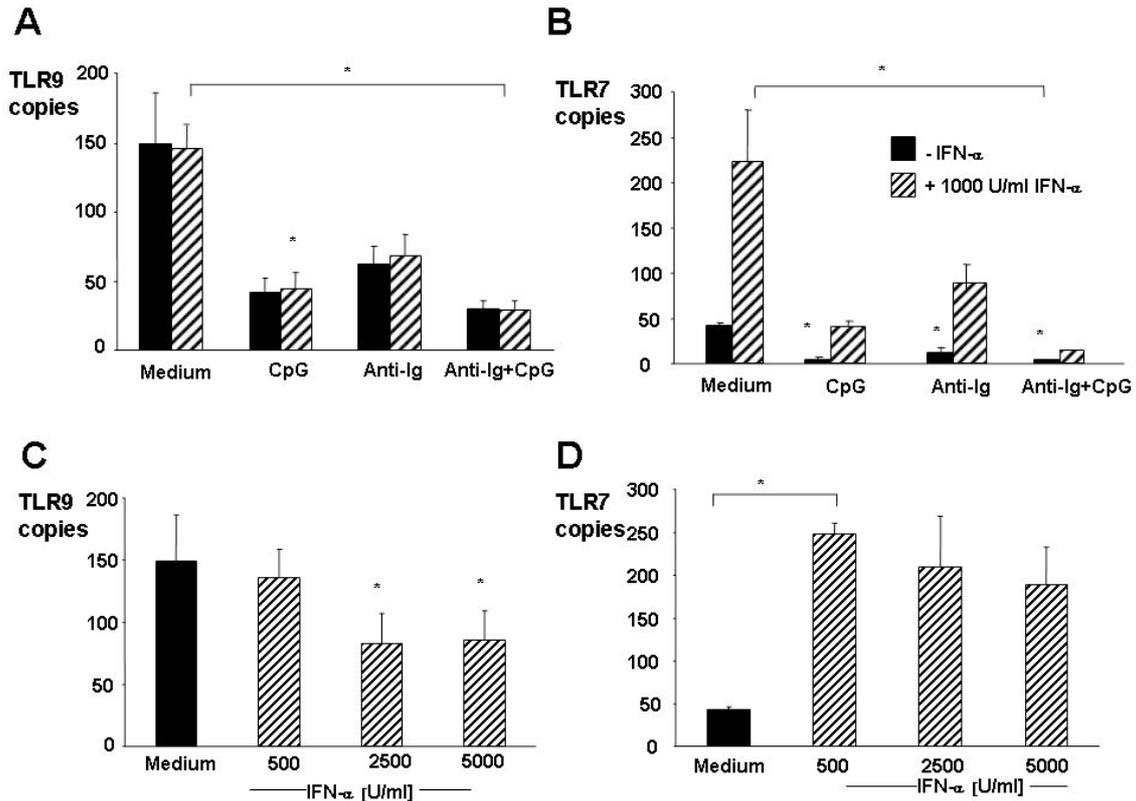


Abbildung 3.2.3 Die Expression von TLR9 und TLR7 wird durch IFN- α beeinflusst

B-Zellen wurden aus PBMCs mit Hilfe des CD19-Isolations-Kit isoliert und danach für 12 h in Kultur gegeben (1×10^6 /ml in 24-well Platten). Stimuliert wurden die B-Zellen mit Anti-Ig ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$), CpG-B ($3 \mu\text{g}/\text{ml}$) und IFN- α ($1000 \text{ IU}/\text{ml}$). Nach 12 h wurde die TLR9-mRNA Expression (A) und TLR7-mRNA Expression (B) mittels *real-time*-PCR analysiert und ist dargestellt als die Anzahl der Transkripte pro 10^3 Kopien des *housekeeping genes* Cyclophilin-B. Für die Abbildungen C und D wurden B-Zellen wie oben beschrieben isoliert und nur mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN- α stimuliert. Nach 12 h wurde die TLR9-mRNA-Expression (C) und TLR7-mRNA-Expression (D) mittels *real-time*-PCR analysiert. Die Mittelwerte und SEM von $n=4$ unabhängigen Experimenten sind hier dargestellt.

3.3 TLR-Expressionsmuster von Subpopulationen humaner B-Zellen aus peripherem Blut

Als nächstes interessierte vor allem, ob die TLR9-Expression in unstimulierten B-Zell-Subpopulationen, d.h. naiven und memory B-Zellen, mit dem Antwortverhalten der B-Zellen nach Immunstimulation korreliert. Basierend auf der unterschiedlichen Expression von CD27 und IgD auf humanen B-Zellen besteht das periphere Blut vorwiegend aus naiven B-Zellen ($\text{CD}27^-$, IgD^+) und memory B-Zellen ($\text{CD}27^+$, IgD^-)¹⁶⁹.

Um nun reine B-Zell-Subpopulationen zu erhalten, wurden CD19⁺ B-Zellen (n=3) aus dem peripheren Blut isoliert und nach der Isolation mit Anti-CD27 PE und Anti-IgD FITC fluoreszenzmarkiert. Die durchflusszytometrisch ermittelte Reinheit der isolierten B-Zellen lag bei >95%. In **Abbildung 3.3A** sieht man die unterschiedliche Verteilung der B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut bei einem repräsentativen Spender. Bis zu 60-70% der humanen B-Zellen sind (CD27⁻, IgD⁺) naive B-Zellen und 15-20% (CD27⁺, IgD⁻) memory B-Zellen.

Um reine B-Zell-Subpopulationen für die TLR-Analyse zu erhalten, wurden die isolierten B-Zellen mit fluoreszenzmarkierten Anti-CD27 PE und Anti-IgD FITC angefärbt. Danach wurden die B-Zellen (jeweils mindestens 300.000 Zellen pro Subpopulation) mittels eines speziellen "Zellsorters" aufgetrennt (zur genaueren Technik siehe Material und Methoden Abschnitt 2.7.5) und für 3 h ohne die Zugabe eines Stimulus in RPMI-Medium (10% FCS) in 200 µl 96-Rundbodenwells bei 37°C inkubiert. Die TLR-Analyse erfolgte mittels *real-time*-PCR.

Wie **Abbildung 3.3B** zeigt, war die TLR9-Expression in naiven B-Zellen niedriger als in memory B-Zellen (naive B-Zellen, 10 +/- 0,5 Kopien TLR9-mRNA/10³ des *housekeeping genes* cyclophilin B, n=2; memory B-Zellen 30,05 +/- 6 Kopien TLR9-mRNA/10³ des *housekeeping genes* cyclophilin B, n=2), während die TLR7-Expression in beiden B-Zell-Typen ungefähr gleich blieb. In diesem Sinne ist es interessant zu vermerken, dass trotz der niedrigeren TLR9-Expression in naiven B-Zellen die Zytokinwerte nach Stimulation mit CpG-C und Anti-Ig sowie in Gegenwart der PDC konstant höher waren als in memory B-Zellen. Die Plasmazelldifferenzierung und Immunglobulinproduktion waren jedoch in memory B-Zellen höher. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass TLR9-Expressionsmuster nicht unbedingt mit dem Aktivierungsmuster korrelieren müssen. In **Abbildung 3.3C** erkennt man außerdem, dass alle B-Zell-Subpopulationen TLR1, TLR2, TLR6, TLR7, TLR9 und TLR10 besitzen.

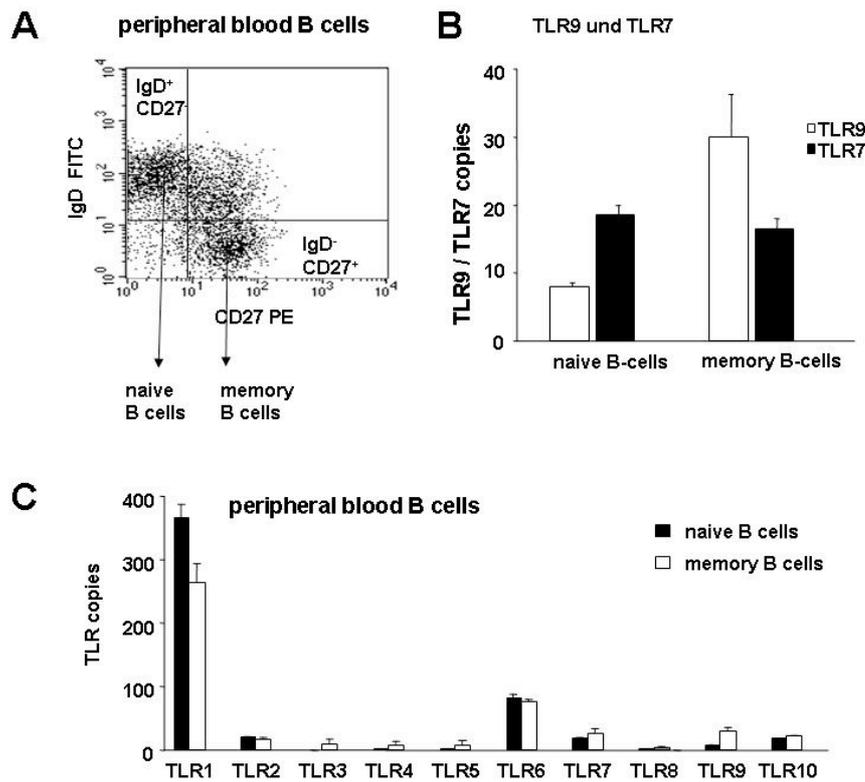


Abbildung 3.3 TLR-Expression in naiven und memory B-Zellen

Um die TLR-Expression in verschiedenen B-Zell-Subpopulationen zu analysieren, wurden CD19⁺ B-Zellen aus PBMCs isoliert. Ein gängiges Merkmal von somatisch mutierten B-Zell-Subpopulationen ist die Expression des Oberflächenmoleküls CD27. Die B-Zellen wurden dann mit Anti-CD27 PE und Anti-IgD FITC fluoreszenzmarkiert und in ihre Subpopulationen aufgetrennt (A). Für die Analyse der TLR9- und TLR7-mRNA-Expression in naiven und memory B-Zellen (B) sowie für das gesamte TLR-Expressionsmuster (C) wurden jeweils mindestens 300.000 Zellen pro Subpopulation in 200 μ l 96-Rundbodenwells eingesetzt und für 3 h ohne die Zugabe eines Stimulus in RPMI-Medium (10% FCS) bei 37°C inkubiert. Die TLR-Analyse erfolgte mittels *real-time*-PCR. Die Mittelwerte und SEM von n=2 unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

4. Diskussion

4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit weisen auf eine neue Rolle von PDCs in der Regulation der humoralen Immunantwort hin. Diese neue biologische Funktion der PDCs besteht demnach in der Fähigkeit, eine T-Zell-unabhängige Entwicklung des humanen B-Lymphozyten zur Antikörper-produzierenden Zelle zu initiieren. Wie gezeigt, kann dieser funktionelle Synergismus von PDCs und B-Zellen vor allem durch eine Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors mittels Anti-Ig und gleichzeitiger Stimulation mittels des TLR9-Liganden CpG-C getriggert werden.

So konnte beobachtet werden, dass PDCs humane B-Zellen, die bereits durch Anti-Ig und gleichzeitigen mikrobiellen Stimulus (CpG-C) aktiviert wurden, synergistisch zur Expression von Oberflächenmarkern anregen (CD86) und deren Zytokinproduktion (IL-6, TNF- α , IL-10) fördern. Darüber hinaus förderten PDCs die Plasmazelldifferenzierung und auch die Immunglobulinproduktion (IgM und IgG) humaner B-Zellen.

In aufgetrennten naiven und memory B-Zellen war die alleinige Kombination von CpG-C und Anti-Ig nicht ausreichend, um eine Plasmazelldifferenzierung oder eine Immunglobulinproduktion zu induzieren. Erst die Zugabe von PDCs zu diesen Zellkulturen konnte die Ausdifferenzierung der naiven und memory B-Zellen zur Plasmazelle einleiten. In Übereinstimmung mit den Daten der Plasmazelldifferenzierung konnten die PDCs in den Zellkulturen mit naiven B-Zellen hauptsächlich die Produktion von IgM induzieren, während die memory B-Zellen hauptsächlich IgG sezernierten.

Auf der Suche nach dem Mechanismus wurde deutlich, dass die funktionelle Einheit zwischen B-Zellen und PDCs vor allen Dingen durch lösliche Faktoren zustande kam. So konnten humane B-Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen IFN- α stimuliert wurden, ihre IL-6 und IL-10, aber auch die IgM-Produktion signifikant steigern. Diese Arbeit zeigt jedoch, dass – abgesehen von löslichen Faktoren – ein weiterer wichtiger Mechanismus ein direkter Zell-Zell-Kontakt in dem Zusammenspiel von B-Zelle und PDC sein könnte, insbesondere unter Berücksichtigung der Zytokinproduktion (IL-6, IL-10) und auch der Plasmazelldifferenzierung.

Eine weitere wichtige Erkenntnis dieser Arbeit bestand in der Analyse des TLR9-Expressionsmusters der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen. So war die TLR9-Expression auf mRNA-Ebene in naiven B-Zellen niedriger als in memory B-Zellen. In nicht aufgetrennten B-Zellen nahm die TLR9-Expression sowohl durch die Kombination von CpG-ODN und Anti-Ig als auch durch CpG-ODN alleine signifikant ab. IFN- α hatte hinsichtlich der TLR9-Expression ebenfalls einen supprimierenden Effekt. Eine Hochregulation von TLR9 war somit nicht an der verstärkten Aktivierung von humanen B-Zellen durch die PDC, CpG und Anti-Ig beteiligt.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit bestand darin, die direkten und indirekten Effekte von CpG-C auf B-Zellen und PDC im humanen Immunsystem zu untersuchen und die zugrunde liegenden Mechanismen zu skizzieren. So bewirkte CpG-C, einer Virusinfektion vergleichbar, eine massive Induktion von IFN Typ I in PDCs. In humanen B-Zellen förderte CpG-C vor allem in Kombination mit Antigen (Anti-Ig) die Expression von Oberflächenmarkern (CD86), die Zytokinsynthese (IL-6, IL-10, TNF- α) und die Immunglobulinproduktion (IgM und IgG). Über die Induktion von IFN- α in PDCs kam es zu einer noch stärkeren Aktivierung humaner B-Zellen. In Analogie dazu ließen sich antigenerfahrene B-Zellen durch CpG-C zu einer erhöhten Plasmazelldifferenzierungsrate und erhöhter Immunglobulinproduktion stimulieren. Ein "Isotype Switch" von naiven B-Zellen wird durch CpG-C jedoch nicht erreicht. Eine eigene schematische Übersicht zu den unterschiedlichen Effekten der neuen CpG-Klasse zeigt **Abbildung 4.1**.

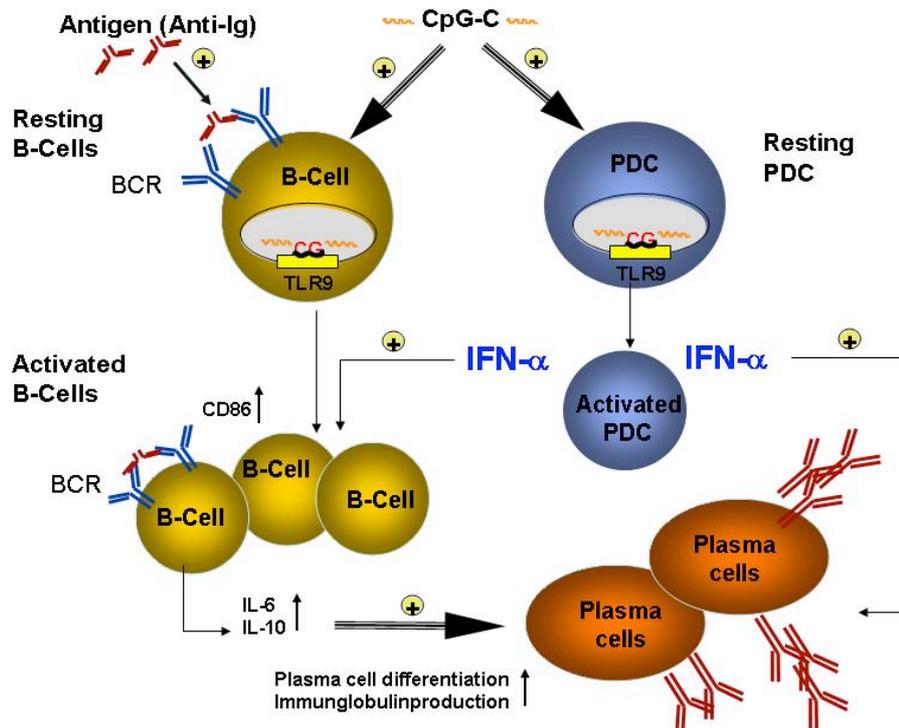


Abbildung 4.1 Effekte der neuen CpG-Klasse im humanen Immunsystem

PDCs und B-Zellen werden direkt durch CpG-C stimuliert. CpG-C (Prototyp M352) induziert große Mengen IFN- α in PDCs und stimuliert in Kombination mit Anti-Ig B-Zellen. Durch PDC-abhängiges IFN- α stimuliert CpG-C B-Zellen in Kombination mit Anti-Ig zur Expression von Oberflächenmarkern, Zytokinen (IL-6 und IL-10) und Immunglobulinproduktion. Die Plasmazelldifferenzierung wird durch IFN- α , IL-6 und IL-10 gefördert.

4.2 Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur

4.2.1 Die PDC als Ersatz für T-Zell-Hilfe?

Wie bereits erwähnt, lassen sich im humanen System zumindest phänotypisch zwei verschiedene DC-Subpopulationen im peripheren Blut unterscheiden – die myeloide unreife CD11c⁺ DC (MDC) und die CD11c⁻ plasmazytoide DC (PDC). Die myeloide und die plasmazytoide DC reagieren sehr unterschiedlich auf TLR-Stimulation, was unterschiedliche Funktionen der TLRs annehmen lässt. So sezernieren aktivierte MDCs hohe Mengen an IL-12 und proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α , während die PDCs hohe Mengen IFN- α produzieren. Diese Zellen sind für den Großteil der IFN- α -Produktion während einer Virusinfektion verantwortlich⁹. Allgemein formuliert kontrolliert IFN- α während einer Virusinfektion die virale Replikation. Dies geschieht je-

doch nicht nur über Mechanismen der angeborenen Immunität, sondern auch Mechanismen der adaptiven Immunität wie der Aktivierung von NK-Zellen, der Auslösung einer T_H1 -Antwort¹² sowie der Produktion von Antikörpern¹³. Darüberhinaus modulieren PDCs abhängig vom Reifungssignal, das sie empfangen, die T-Zell-Entwicklung entweder in Richtung IFN- γ oder IL-4 sezernierender T-Zellen⁴³ oder gar in Regulator-T-Zellen⁴⁵.

In dieser Arbeit wird deutlich, dass PDCs außerdem in der Lage sind, die Entwicklung der humanen B-Zelle ohne T-Zell-Hilfe zu fördern, und somit eine neue Kontrollfunktion wahrnehmen. Die Rolle der dendritischen Zelle (DC) in der Aufrechterhaltung der humoralen Immunantwort ist schon seit einiger Zeit bekannt. So wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass 1. die MDCs erst $CD4^+$ T-Zellen aktivieren müssen und 2. die nun aktivierten $CD4^+$ T-Zellen die Entwicklung der naiven B-Zellen zur Plasmazelle einleiten^{182, 183}. Diese Studien haben aber nicht berücksichtigt, dass DCs möglicherweise auch direkt mit B-Zellen interagieren. Die Arbeitsgruppe um Fayette konnte jedoch in verschiedenen Studien zeigen, dass MDCs, welche aus $CD34^+$ -hämatopoetischen Stammzellen generiert worden waren, B-Zellen sowohl zur Plasmazelldifferenzierung anregen als auch einen "Isotype Switch" zu IgA-produzierenden Zellen induzieren können^{98, 99}. Vor allen Dingen die folliculären DCs sind in der Lage, durch die Sezernierung von IL-10 und IL-6 eine Differenzierung naiver B-Zellen zur Plasmazelle einzuleiten⁹⁷. Es ist wichtig hier zu erwähnen, dass in den meisten dieser Studien nicht nur naive B-Zellen, sondern auch die DCs über eine CD40-CD40L Interaktion aktiviert werden mussten, um eine Ausdifferenzierung zur Plasmazelle zu bewirken.

In der hier vorliegenden Arbeit war jedoch eine Stimulation humaner B-Zellen mit CD40L nicht nötig. Um eine Ausdifferenzierung der humanen B-Zelle zur Plasmazelle zu bewirken reichte es, humane B-Zellen zusammen mit PDCs in Kultur zu geben und diese Zellen dann mit Anti-Ig und CpG-C zu stimulieren. Es sei hier jedoch kritisch bemerkt, dass nicht nur aktivierte T-Zellen, sondern auch aktivierte Endothelzellen¹⁸⁴, Mastzellen¹⁸⁵, Thrombozyten¹⁸⁶ und auch aktivierte B-Zellen selbst CD40L exprimieren können¹⁸⁷. Unter diesen Bedingungen könnte ebenso eine T-Zell-unabhängige Immunantwort möglich sein. Es ist allerdings sehr unwahrscheinlich, dass in der hier vorliegenden Arbeit Mastzellen oder Thrombozyten vorhanden waren, da diese durch die Zellisolationsschritte herausgelöst worden sind. Ausschließen kann man allerdings

nicht die Möglichkeit einer Selbststimulation der B-Zellen durch CD40L und die Möglichkeit, dass CD40L durch eine Kostimulation über CpG-ODN, Anti-Ig und der PDC auf der B-Zelle induziert wird.

Wie neu war nun aber diese Entdeckung der T-Zell-unabhängigen B-Zell-Entwicklung?

4.2.2 Die T-Zell-unabhängige B-Zell-Entwicklung

Dass humane B-Zellen ohne Beteiligung von T-Zellen eine Immunantwort auslösen können ist schon länger bekannt. In diesem Sinne ist es wichtig zu erwähnen, dass bestimmte Antigene existieren, die, bezogen auf ihre Fähigkeit eine Antikörperproduktion von humanen B-Zellen auszulösen, in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden können: 1. Die T-Lymphozyten-abhängigen oder *thymus-dependent* (TD)-Antigene und 2. die T-Lymphozyten-unabhängigen oder *thymus-independent* (TI)-Antigene. TI-Antigene können eingeteilt werden in TI-Typ1-Antigene, die B-Zellen unter Umgehung ihres BCR polyklonal aktivieren können (z.B. CpG-ODN) und TI-Typ2-Antigene, die aus Molekülen wie den bakteriellen Zellwandpolysacchariden mit hochrepetitiven Strukturen bestehen (z.B. bakterielle, kapsuläre Polysaccharide von *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) und über den B-Zell-Rezeptor erkannt werden.

So weisen neuere Entwicklungen der B-Zellbiologie daraufhin, dass B1-B-Zellen, eine spezielle Subpopulation von B-Zellen, die vor allem in der Pleura und dem Peritoneum des Menschen gefunden werden, T-Zell-unabhängig reguliert werden können. Auch die "konventionellen" B2-B-Zellen, die sich vor allem in der Milz befinden, können eine T-Lymphozyten-unabhängige Immunantwort induzieren. Eine Plasmazelldifferenzierung aus dieser Gruppe von naiven B-Zellen ist jedoch normalerweise limitiert auf eine spezielle Untergruppe von TI-Antigenen und auf einige virale Infektionen *in vivo*¹⁸⁸. In letzter Zeit haben sich jedoch einige Forschergruppen mit dem Phänomen der T-Zell-unabhängigen Immunantwort weiter beschäftigt.

So konnte die Gruppe um Litinsky zeigen, dass MDCs die B-Zell-Differenzierung und das "Isotype Switching" ohne T-Zell-Hilfe unterstützen können¹⁰⁰. Litinsky et al.

konnten demonstrieren, dass zwei neue Liganden auf DCs und Monozyten – BlyS (*B lymphocyte stimulator*) und APRIL (*A proliferation inducing ligand*) – und spezifische

korrespondierende Rezeptoren auf B-Zellen (wie z.B. BCMA = *B cell maturation antigen*) zu einer CD40L-unabhängigen B-Zellantwort führen. Es wäre sehr interessant zu erfahren, ob PDCs durch eine Aktivierung via CpG-C diese Oberflächenmoleküle (d. h. BlyS und APRIL) exprimieren.

Zusätzlich konnte die Gruppe um Bernasconi erst kürzlich demonstrieren, dass die Immunglobulinproduktion von humanen B-Zellen sowohl durch CpG-ODN als auch durch Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors ohne T-Zell-Hilfe gefördert werden kann^{120, 150}.

Unter besonderen Bedingungen kann die Entwicklung des B-Lymphozyten zur Antikörper-sezernierenden Zelle somit ein Phänomen darstellen, das die Hilfe der T-Helferzellen nicht benötigt.

Die hier vorliegende Arbeit bestätigt diese Erkenntnisse, indem sie zeigt, dass der richtige mikrobielle Stimulus (hier in Form von CpG-C) und die Mithilfe der PDC zusammen mit gleichzeitiger Aktivierung des B-Zell-Rezeptors ausreichen, eine B-Zell-Differenzierung von naiven und memory B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen zu bewirken.

4.2.3 Die Rolle der PDC in der humoralen Immunantwort

Die erstaunliche Entdeckung eben dieser neuen Fähigkeit von PDCs wird verständlicher, wenn man folgende Punkte berücksichtigt:

1. In der derzeitigen Literatur wird IL-12, welches von CD40L-aktivierten myeloiden dendritischen Zellen sezerniert wird, als Schlüsselzytokin für die Ausdifferenzierung von humanen B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen beschrieben⁹⁷.
2. In den meisten Studien wurden nicht nur CD40L-stimulierte naive B-Zellen, sondern auch CD40L-aktivierte dendritische Zellen erforderlich, um eine Ausdifferenzierung zur Plasmazelle zu erreichen^{98, 99}.

3. Alle diese Studien haben mit der Zugabe löslicher Faktoren z.B. IL-2 und IL-10 oder der Zugabe von CD40L gearbeitet, um humane B-Zellen zur Ausdifferenzierung zu bringen.

4. Überraschenderweise konnte erst kürzlich in einer neuen Studie gezeigt werden, dass auch PDCs in die Differenzierung von CD40L-aktivierten B-Zellen eingreifen können⁷⁸. Diesbezüglich konnte die Arbeitsgruppe um Jego zeigen, dass PDCs, die mit Influenza-Virus stimuliert wurden, die Differenzierung von CD40L-aktivierten B-Zellen zu Plasmazellen via IFN- α und IL-6 unterstützen können. Auf der Basis dieser Ergebnisse konnte die Arbeitsgruppe um Jego ein Modell vorschlagen, welches sich vor allem auf die Entwicklung einer virusspezifischen, humoralen Immunantwort bezieht (siehe **Abbildung 4.2.1**). Demzufolge sezernieren PDCs infolge viraler Stimulation IFN- α und IL-6, differenzieren in reife DCs und präsentieren möglicherweise virale Antigene an CD4-T-Zellen⁸¹. CD4-T-Zellen sezernieren daraufhin IL-2 und exprimieren CD40L, welcher B-Zellen aktiviert. PDC-abstammendes IL-6 und IFN- α führen zu einer Differenzierung der humanen B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Desweiteren wird gezeigt, dass B-Zellen, die vornehmlich durch die PDC stimuliert worden sind, vor allem IgG und weniger IgM sezernieren. Das könnte darauf hinweisen, dass PDCs vor allem memory B-Zellen aktivieren.

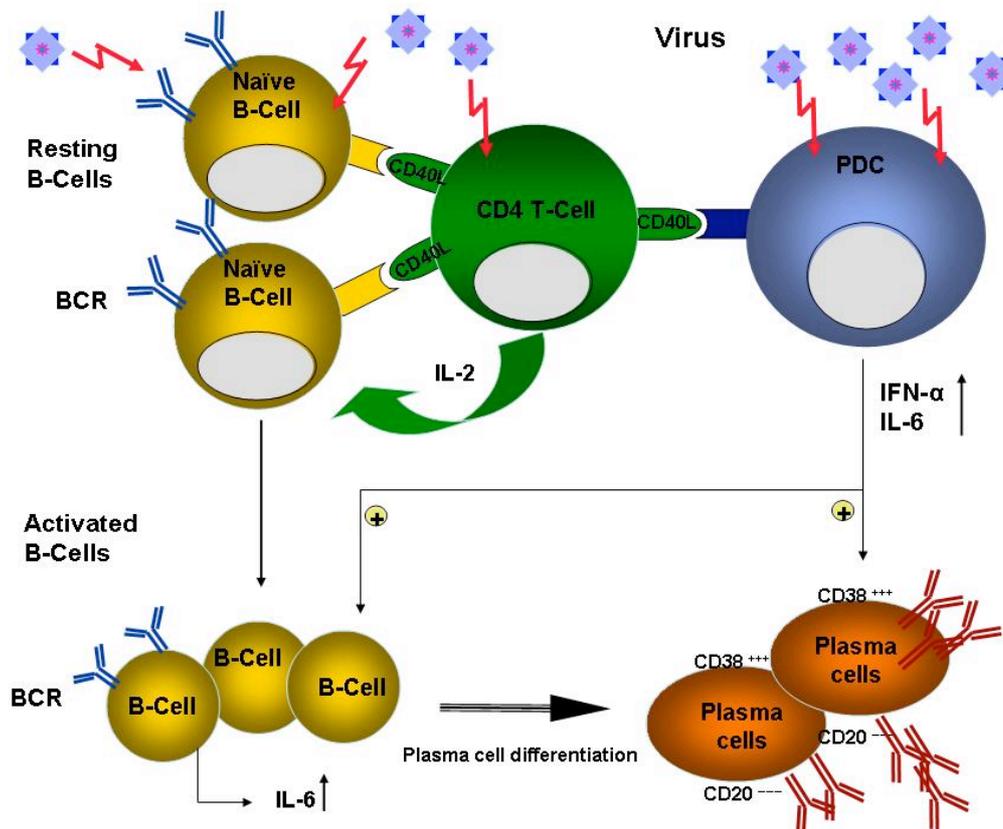


Abbildung 4.2.1 PDCs induzieren Plasmazelldifferenzierung durch IFN- α und IL-6

Auf Virusstimulation sezernieren PDCs IFN- α und IL-6. Daraufhin treten die PDCs in Kontakt mit CD4-T-Zellen, die sofort IL-2 sezernieren und CD40L exprimieren. Aktivierte B-Zellen differenzieren durch die IL-6- und IFN- α -Sekretion der PDCs zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Die T-Zellen helfen vor allen Dingen durch die Bereitstellung von IL-2. (Adaptiert nach Jego et al. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6; *Immunity* 2003. 19(2): p. 225-234).

Zusammenfassend kann man also behaupten, dass zusätzlich zu der T-Zell-abhängigen Aktivierung von B-Zellen auch DCs, einschließlich der PDC, regulatorisch in die B-Zell-Entwicklung eingreifen können. Das Interessante an der hier vorliegenden Arbeit ist, dass keine Kostimulation in Form von CD40L oder gar die Zugabe löslicher Faktoren, wie z.B. IL-2 und IL-10, zur Anwendung kam, um eine Plasmazelldifferenzierung zu ermöglichen. In dieser Arbeit scheint CpG-C ein guter Ersatz sowohl für die virale Stimulation von PDCs als auch für die CD40L-vermittelte Aktivierung von B-Zellen zu sein.

Jego's Arbeit zeigt darüber hinaus, dass PDCs vor allem die Produktion von IgG und nicht von IgM fördern. Das ließ schlussfolgern, dass PDCs entweder spezifisch memory

B-Zellen zur Antikörperproduktion aktivieren können oder die naiven B-Zellen den "Isotype Switch" zu IgG vollzogen haben.

Die hier vorgelegte Arbeit hat trotz der Hinweise in der Literatur, dass IFN- α einen Immunglobulinklassenwechsel *in vivo* erzielen kann¹³, keine Hinweise dahingehend ergeben, dass PDCs trotz der hohen IFN- α Mengen in den Zellkulturen mit naiven B-Zellen den "Isotype-Switch" unterstützen können. Hier förderte die PDC in humanen B-Zellen, die sowohl mit CpG-C als auch mit Anti-Ig stimuliert worden waren, insbesondere die Plasmazelldifferenzierung und auch die IgM und IgG-Produktion. In den aufgetrennten Zellkulturen mit naiven und memory B-Zellen war die alleinige Kombination von CpG-C und Anti-Ig nicht ausreichend, um eine Plasmazelldifferenzierung zu induzieren. Erst die Zugabe der PDC zu diesen Zellkulturen konnte die Ausdifferenzierung der naiven und memory B-Zelle zur Plasmazelle einleiten. In Übereinstimmung mit den Daten der Plasmazelldifferenzierung konnten die PDCs in den Zellkulturen mit naiven B-Zellen hauptsächlich die Produktion von IgM induzieren, während die memory B-Zellen hauptsächlich IgG sezernierten.

Die Daten der hier vorliegenden Arbeit lassen somit schlussfolgern, dass die PDC alleine nicht in der Lage ist, die wichtige Interaktion von T- und B-Zelle für den "Isotype Switch" zu ersetzen. Aus der Literatur geht außerdem hervor, dass andere Subpopulationen dendritischer Zellen für den "Isotype Switch" von CD40L-aktivierten naiven B-Zellen verantwortlich sind^{98,99}. In Analogie dazu wurde berichtet, dass Mäuse, die keine T-Zellen mehr haben (so genannte MHC-II *Knock-Out* Mäuse), immer noch in der Lage sind, eine beachtliche Immunantwort in Form von neutralisierenden IgM-Antikörpern gegen das Glykoprotein des *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) auszulösen¹⁸⁹. Im Gegensatz zur IgM-Produktion scheint die IgG-Antwort somit stark abhängig von T-Zell-Hilfe zu sein, da in diesen Experimenten kein IgG detektiert werden konnte.

Auch hier kann man wieder Parallelen zwischen dieser und der eben vorgestellten Arbeit ziehen. So scheinen PDCs in der hier vorgelegten Arbeit in quantitativer Hinsicht vor allem die IgM-Produktion von naiven B-Zellen zu fördern. PDCs könnten demnach verantwortlich für die schnelle primäre Unterstützung der T-Zell-unabhängigen Immunantwort während viraler Infektionen *in vivo* sein.

Dazu kommt, dass PDCs interessanterweise in den T-Zell-Arealen der sekundären lymphatischen Organe vorkommen, welches aus immunhistochemischen Färbungen bekannt ist⁸⁸. Von da aus gelangen die PDCs, ähnlich den T-Zellen, in die äußeren T-Zell-Zonen, von denen bekannt ist, dass hier B-Zellen mit T-Zellen interagieren¹⁰¹. In dieser Zone wäre also ein potentiell T-Zell-unabhängiger Kontakt der naiven B-Zelle mit der PDC möglich und könnte der Auslöser einer primären schnellen Immunantwort während viraler Infektionen sein. Dass PDCs jedoch in den Zellkulturen mit naiven B-Zellen hauptsächlich die Produktion von IgM und nicht IgG förderten, führte zu der Schlussfolgerung, dass PDCs alleine nicht in der Lage sind, die wichtige Interaktion von T- und B-Zelle für den "Isotype Switch" zu ersetzen. Mit ihrer Hilfe können die B-Zellen jedoch, wenn sie zusätzlich über ihren B-Zell-Rezeptor über Antigen aktiviert werden und einen gleichzeitigen mikrobiellen Stimulus erhalten, die für die Plasmazell-differenzierung wichtigen Zytokine IL-6 und IL-10 selber sezernieren und eine schnelle Immunantwort einleiten.

In Anbetracht der hier vorgestellten Ergebnisse kann das von Jago vorgestellte Modell um folgende Punkte verändert werden:

1. Wir benutzen CpG-C und keinen Virus, um hohe Mengen an IFN- α in PDCs zu induzieren.
2. IL-6 und IL-10 werden von den B-Zellen selbst nach Stimulation mit CpG-C, Anti-Ig und IFN- α sezerniert.
3. Wir benötigen keinen CD40L.
4. PDCs aktivieren sowohl naive als auch memory B-Zellen zur Immunglobulinproduktion ohne einen "Isotype Switch" in naiven B-Zellen vollziehen zu können. Als eigene schematische Zusammenfassung dieser Erkenntnisse dient **Abbildung 4.2.2**.

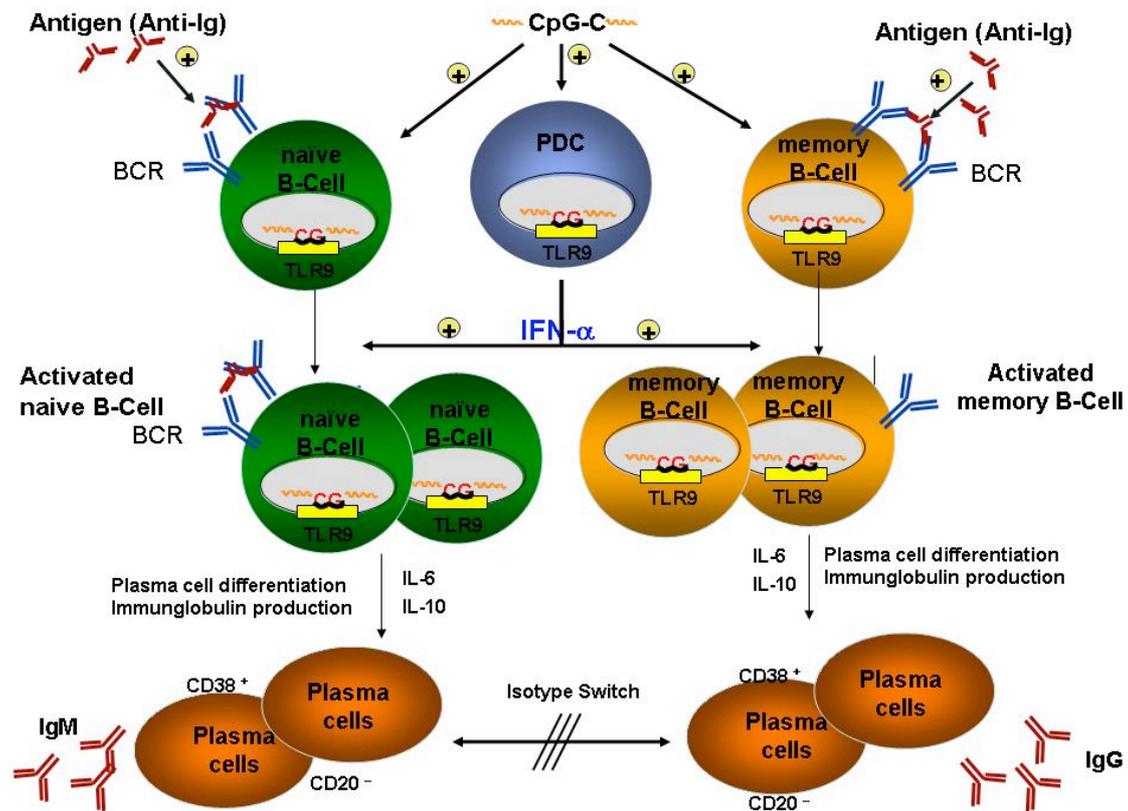


Abbildung 4.2.2 PDCs als Ersatz für T-Zell-Hilfe

Naive (linker oberer Quadrant, grüner Kreis) und memory B-Zellen (rechter oberer Quadrant, gelber Kreis) wurden mittels CpG-C und Anti-Ig über Ihren B-Zell-Rezeptor stimuliert. Gleichzeitig werden PDCs (oben Mitte, blauer Kreis) durch CpG-C aktiviert. Auf CpG-C-Stimulation sezernieren PDCs IFN- α . Daraufhin werden die gerade aktivierten B-Zellen durch IFN- α zur weiteren Differenzierung angeregt. Die B-Zellen sezernieren daraufhin in Gegenwart der PDC vor allem IL-6 und IL-10 und reifen zu CD38⁺CD20⁻ Plasmazellen aus. In Gegenwart der PDC sezernieren naive B-Zellen insbesondere IgM, memory B-Zellen vor allem IgG. Erstaunlicherweise ist in diesem System keine T-Zell-Hilfe durch die Bereitstellung von IL-2 und CD40L vorhanden. Naive B-Zellen konnten jedoch nicht den "Isotype Switch" zu IgG vollziehen.

4.3 Mögliche Mechanismen im Hinblick auf die Induktion der adaptiven Immunantwort

4.3.1 Lösliche Faktoren oder Zell-Zell-Kontakt

Es ist bekannt, dass T-Zell-Hilfe (CD40L) verantwortlich ist für die endogene Produktion von IL-10 und IL-6 in B-Zellen und dass beide Zytokine eine kritische Rolle in der Differenzierung von CD40L-aktivierten B-Zellen ausüben¹⁷⁵. Interessanterweise wurde IFN- α in der hier vorgelegten Arbeit als einer der löslichen Faktoren identifiziert, der IL-6 und IL-10 in Anti-Ig und CpG-ODN-stimulierten B-Zellen induziert. Erstaunli-

cherweise war der Effekt auf die Zytokinsynthese in der Abwesenheit von CpG-ODN oder Anti-Ig trotz IFN- α Zugabe sehr gering. Welche Rolle ein direkter Zell-Zell-Kontakt in diesem System spielte, führte zu unterschiedlichen Ergebnissen:

1. Die Trennung von B-Zellen und PDCs führte zu einer signifikanten Abnahme von CD86, IL-6 und IL-10. Analog dazu führte die Abnahme der Zytokinproduktion von IL-6 und IL-10 zu einer verminderten Plasmazelldifferenzierung. Diese Entdeckung unterstreicht die wichtige Rolle genau dieser beiden Zytokine in der B-Zell-Differenzierung und bestätigt die vorangegangenen Studien^{78, 175}. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht eindeutig und führten zu der Hypothese, dass für die gesteigerte B-Zell-Aktivierung eine Kombination aus Zell-Zell-Kontakt und löslichen Faktoren wichtig zu sein scheint.

2. In Bezug auf die Immunglobulinproduktion konnte kein Hinweis für direkten Zell-Zell-Kontakt festgestellt werden, obwohl die Ergebnisse der Plasmazelldifferenzierung diesen erwarten ließen. So konnte man schlussfolgern, dass CpG-induzierte lösliche Faktoren (IL-10, IL-6, IFN- α) die Immunglobulinproduktion von B-Zellen verstärken. In Übereinstimmung mit der schon erwähnten Studie von Jego⁷⁸ kann mit der hier vorliegenden Arbeit ein funktioneller Synergismus von PDC-abhängigen IFN- α und dem von der humanen B-Zelle produzierten IL-6 postuliert werden.

4.3.2 IFN- α inhibiert den “Isotype Switch” von humanen B-Zellen

Bezüglich der Generierung von humanen Antikörper-produzierenden Plasmazellen stellt Jego's Arbeit IFN- α in den Mittelpunkt und liefert damit eine Erklärung für einen zellulären Mechanismus früherer Studien, die eine erhöhte Antikörperproduktion nach Stimulation mit IFN- α nachweisen konnten¹⁹⁰⁻¹⁹². Diese Funktion von IFN Typ I in der Plasmazelldifferenzierung reiht sich nahtlos in die Liste der durch IFN- α vermittelten immunmodulatorischen Effekte ein, die schon in einigen Studien beschrieben worden sind¹⁹⁰⁻¹⁹². Außerdem erklärt es den beobachteten adjuvanten Effekt von IFN Typ I auf die humorale Immunität. So konnte Le Bon in einer Studie zeigen, dass IFN- α in der Lage ist, über die Einbeziehung von MDCs als sehr potentes Immunstimulans zu fungieren. Diese Erkenntnisse weisen daraufhin, dass IFN- α eine Schlüsselrolle in der Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität einnimmt³⁴.

In der hier vorliegenden Arbeit scheinen PDCs über ihre IFN- α -Produktion einen Ersatz für die sonst benötigte T-Zell-Hilfe darzustellen. Neben der Funktion als dendritische Zelle ist nämlich ein weiteres Charakteristikum von PDCs, dass sie hohe Mengen von IFN Typ I nicht nur als Antwort auf eine Virusinfektion produzieren, sondern auch auf eine Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden^{65, 72, 193}. Neuere Studien zeigen, dass auch die DNA eines Virus TLR9 mit einbeziehen kann und zu einer erhöhten Sekretion von IFN- α durch PDCs führt¹⁹⁴. Die Effekte von IFN- α in der hier vorliegenden Arbeit sind konzentrationsabhängig. So produzierten B-Zellen in den hier durchgeführten Versuchen wenig IL-6 und IL-10 nach Stimulation mit Anti-Ig oder CpG-ODN alleine. Der Synergismus aus Anti-Ig und CpG-ODN sorgte jedoch für eine erhöhte Induktion von IL-6 und IL-10, was sich durch IFN- α noch signifikant steigern ließ. Auch die Produktion von IgM war durch IFN- α weiter gefördert worden.

Ferner war schon in früheren Arbeiten berichtet worden, dass IFN- α die Immunantwort von B-Zellen verstärken und den "Isotype-Switch" zu IgG-produzierenden Plasmazellen *in vivo* induzieren kann¹³. Somit überraschte in der hier vorliegenden Arbeit die Steuerbarkeit der IgG-Produktion humaner B-Zellen durch IFN- α . Auch hier sah man wieder einen Synergismus zwischen Anti-Ig und CpG-ODN. Anders als erwartet hatte IFN- α hier allerdings einen hemmenden Effekt auf die IgG-Produktion von B-Zellen, der umso stärker wurde, je höher die Menge an eingesetztem IFN- α war.

Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass PDCs die Synthese von IL-6, IL-10 und IgM durch IFN- α fördern können, während die IgG-Produktion von B-Zellen sogar durch IFN- α verringert werden konnte. In Analogie dazu gab es, wie bereits erwähnt, in der hier vorliegenden Arbeit keine Hinweise dafür, dass PDCs in der Zellkultur mit B-Zellen einen "Isotype Switch" unterstützen könnten.

Das würde bedeuten, dass die erhöhte Induktion von Immunglobulinen (IgG) in unseren Zellkulturen höchstwahrscheinlich nicht auf IFN- α zurückzuführen war, sondern dass andere Zytokine wie IL-6 und IL-10 oder noch nicht identifizierte lösliche Faktoren eine Rolle spielen könnten. IFN- α konnte hier nicht die gewünschte Zunahme in der IgG-Produktion bewirken, während IgM konzentrationsabhängig durch IFN- α zu steigern war.

Das geht einher mit unserer Vermutung, dass PDCs insbesondere die primäre, IgM-abhängige Immunantwort unterstützen können, und steht somit im Widerspruch zu Jeggo's Arbeit, in der die PDC's vor allem die IgG-Produktion förderten⁷⁸.

Man muss an dieser Stelle natürlich auch bedenken, dass hier keine CD40L-stimulierten B-Zellen verwendet wurden und dies schon eine Erklärung für den Unterschied sein könnte. Außerdem zeigt das Ausbleiben einer kompletten Aufhebung der B-Zell-Aktivierung durch IFN Typ I-blockierende Antikörper, dass nicht nur hohe Konzentrationen von IFN- α zwischen B-Zellen und PDCs für die Aktivierung entscheidend sind.

Ein weiterer wichtiger Erklärungsansatz für das unterschiedliche Verhalten der B-Zellen bezüglich der Antikörperproduktion könnte auf molekularer Basis liegen. So könnten Unterschiede in der Expressionshöhe des IFN-Rezeptors in humanen B-Zellen diese unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Mehrere Veröffentlichungen zeigen weiterhin, dass IFN Typ I die IL-12-Produktion aktivierter Monozyten und MDCs nachhaltig unterdrückt^{195, 196}. Auch eine PDC-abhängige IL-12-Produktion lässt sich durch einen autokrinen Rückkopplungseffekt via IFN Typ I inhibieren¹⁹⁷. Wie in einer Publikation gezeigt wurde, ist IL-12 jedoch wichtig, um eine effektive Ausdifferenzierung von naiven B-Zellen zu immunglobulinsezernierenden Zellen zu erreichen⁹⁷. Da IFN- α die Expression des IL-12 Rezeptors auf myeloiden dendritischen Zellen induziert, wurde kürzlich postuliert, dass im Zusammenspiel von IL-12 und IFN Typ I die Konzentration von IFN- α eine entscheidene Rolle spielt. Hohe IFN- α -Konzentrationen, wie sie z.B. durch CpG-C induziert werden, könnten IL-12-vermittelte Effekte durch eine komplette Drosselung der IL-12-Produktion aufheben. Niedrige IFN- α Konzentrationen (z.B. durch CpG-B) hingegen könnten jedoch einen synergistischen Effekt durch die Hochregulation des IL-12 Rezeptors haben¹⁹⁸. In eigenen Versuchen konnte interessanterweise kein bioaktives IL-12 in Zellkulturen mit CpG-ODN, Anti-Ig und IFN- α stimulierten B-Zellen nachgewiesen werden. Es wurde auch kein bio-aktives IL-12 in CpG-C aktivierten PDCs nachgewiesen (eigene unveröffentlichte Ergebnisse).

Daraus konnte man schlussfolgern, dass PDCs alleine unfähig sind die enorm wichtige Interaktion von B-Zellen und T-Zellen zu ersetzen und den "Isotype Switch" zu fördern.

4.3.3 BlyS und APRIL

Trotzdem gibt es Hinweise in der Literatur, die darauf hindeuten, dass dendritische Zellen den "Isotype Switch" von B-Zellen fördern^{34, 99, 104}. In Analogie dazu konnte die Gruppe um Litinsky zeigen, dass gerade bezüglich des "Isotype Switch" durch dendritische Zellen Moleküle erforderlich sind, die mit B-Zellen direkt, d.h. durch direkten Zell-Zell-Kontakt, interagieren können. Interessanterweise scheinen gerade myeloide dendritische Zellen zwei Liganden aus dieser TNF-Familie, BlyS und APRIL, auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren. Diese Oberflächenmoleküle führen dazu, dass B-Zellen ohne T-Zell-Hilfe den "Isotype Switch" vollziehen können¹⁰⁰. Erstaunlicherweise können diese Oberflächenmoleküle auf myeloiden dendritischen Zellen durch IFN- α induziert werden^{199, 200}.

Folglich können PDCs über ihre IFN- α -Produktion myeloide dendritische Zellen so aktivieren, dass diese mit B-Zellen direkt interagieren und B-Zellen dadurch den "Isotype Switch" *in vivo* vollziehen, wie Le Bon in ihrer Arbeit gezeigt haben³⁴. Dabei könnte PDC-abhängiges IFN- α dazu führen, dass BlyS und APRIL auf den myeloiden dendritischen Zellen hochreguliert werden und diese dazu befähigen, direkt mit B-Zellen zu interagieren und den "Isotype Switch" einzuleiten. Das Fehlen der MDCs in den hier durchgeführten Experimenten könnte ebenfalls eine Erklärung für das Ausbleiben des "Isotype Switches" liefern. Ob PDCs durch CpG-ODN oder Virusstimulation in der Lage sind, diese Oberflächenmoleküle zu exprimieren, und ob Zytokine in der Lage sind, diese Expression zu modulieren, bleibt Gegenstand derzeitiger Forschung.

Diese Arbeit zeigt also, dass PDCs humane B-Zellen, die bereits durch Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors mittels Anti-Ig und gleichzeitigen mikrobiellen Stimulus (CpG-Oligonukleotiden) aktiviert wurden, synergistisch zur Expression verschiedener Oberflächenmarker anregen (CD86) und deren Zytokin- (IL-6, TNF- α , IL-10) und Immunglobulinproduktion (IgM und IgG) steigern können. Weiterhin kann mit dieser Arbeit demonstriert werden, dass lösliche Faktoren der PDCs, darunter vor allem IFN- α und IL-6 sowie direkter Zell-Zell-Kontakt zu dieser B-Zell-Aktivierung beigetragen haben. Als Zusammenfassung der hier möglichen Mechanismen dient **Abbildung 4.3.1**.

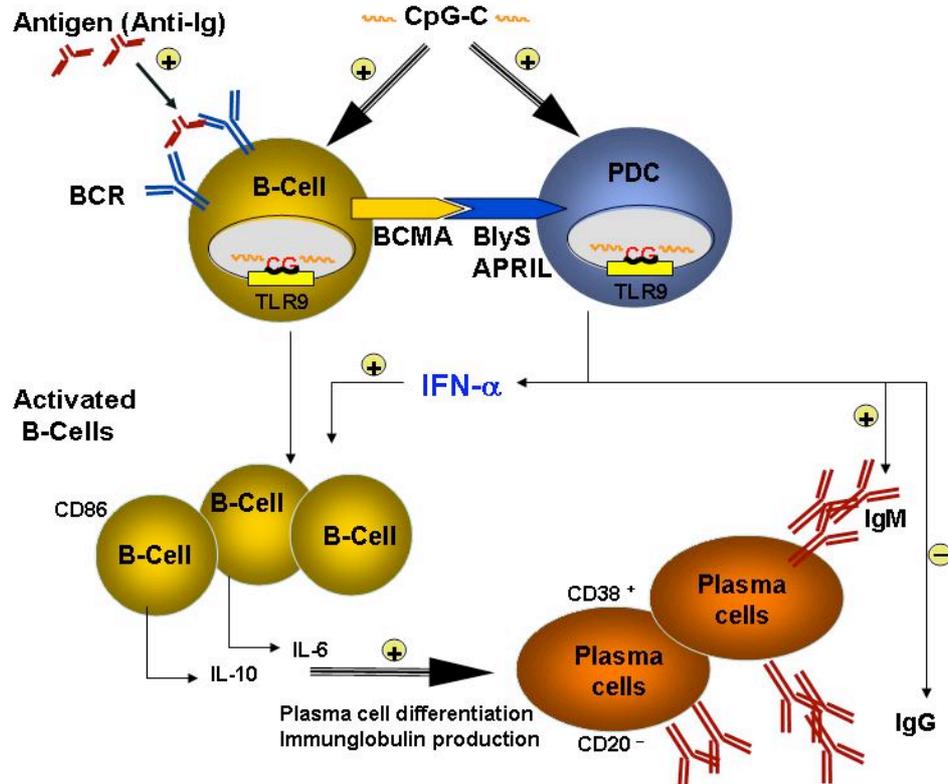


Abbildung 4.3.1 CpG-stimulierte PDCs induzieren Plasmazelldifferenzierung und Immunglobulinproduktion in humanen B-Zellen durch direkten Zell-Zell-Kontakt und durch lösliche Faktoren

Humane B-Zellen (linker oberer Quadrant, gelber Kreis) und PDCs (rechter oberer Quadrant, blauer Kreis) wurden mittels CpG-C und Anti-Ig stimuliert. PDCs und B-Zellen stehen dabei möglicherweise in direktem Zell-Zell-Kontakt (fraglich über BlyS, APRIL-BCMA), was zu einer verstärkten Expression von Oberflächenmarkern (CD86) und Zytokinen (IL-6, IL-10) führt. Auf CpG-C-Stimulation sezernieren PDCs $\text{IFN-}\alpha$. Die Aktivierung der B-Zellen wird durch von der PDC produziertes $\text{IFN-}\alpha$ noch weiter gefördert. IL-6 und IL-10 wie auch direkter Zell-Zell-Kontakt sind verantwortlich für die Plasmazelldifferenzierung ($\text{CD20}^- \text{CD38}^+$), während direkter Zell-Zell-Kontakt nicht für die Immunglobulinproduktion ausschlaggebend zu sein scheint. $\text{IFN-}\alpha$ vermag desweiteren die IgM-Produktion von humanen B-Zellen zu steigern, wirkt aber hemmend auf die IgG-Synthese. Erstaunlicherweise ist in diesem System keine T-Zell-Hilfe durch die Bereitstellung von IL-2 und IL-10 nötig.

4.3.4 Die Rolle von TLR9 bezüglich der Immunstimulation

Zu Beginn dieser Arbeit existierten bereits mehrere Publikationen, die sich mit der TLR-Expression in humanen Lymphozyten befassten. Diese Studien konzentrierten sich jedoch entweder nur auf die TLR-Expression einer speziellen Subpopulation oder es wurde lediglich die differenzielle Expression weniger TLRs auf verschiedenen Subpo-

pulationen untersucht^{49,73,181}. Ferner kamen in diesen Studien Detektionsmethoden zur Anwendung, die lediglich semi-quantitative Aussagen über die Höhe der TLR-Expression zuließen.

In einer kürzlich erschienenen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde jedoch mittels *real-time*-PCR die differentielle TLR-Expression in humanen Leukozytensubpopulationen quantitativ untersucht⁷. Es konnte für humane B-Lymphozyten ein charakteristisches TLR-Profil nachgewiesen werden. So weisen humane B-Zellen eine prominente Expression von TLR1 und TLR6 auf. TLR1 und TLR6 dimerisieren beide mit TLR2 und können so zwischen unterschiedlichen bakteriellen Lipoproteinen diskriminieren, z.B. zwischen Peptidoglykanen und anderen mikrobiellen Bestandteilen¹⁷. B-Zellen exprimieren überdies interessanterweise als einzige Zellpopulation innerhalb von PBMCs TLR10. Es ist somit anzunehmen, dass B-Zellen eine exklusive Rolle in der Detektion korrespondierender PAMPs durch TLR10 zukommt. Die beobachtete fehlende Expression von TLR3 und TLR5 in B-Zellen lässt weiterhin vermuten, dass korrespondierende PAMPs auf B-Zellen keine physiologische Rolle ausüben. Ferner deutet die marginale Expression von TLR4 in B-Zellen an, dass der TLR4-Agonist LPS in dieser Zellpopulation nicht über diesen Erkennungsmechanismus detektiert werden kann.

In Analogie dazu konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass B-Zellen im Gegensatz zu CpG-Stimulation nicht sensitiv auf LPS-Stimulation reagieren²⁰¹. Ferner konnte in humanen B-Zellen neben einer hohen Expression von TLR9 auch TLR7 nachgewiesen werden. Ergänzend zu den gerade beschriebenen Feststellungen konnte in der hier vorliegenden Arbeit auch durch das äußerst sensitive und quantifizierbare Verfahren der *real-time*-PCR eine genaue Expressionsanalyse der Familie der TLRs in verschiedenen B-Zell-Subpopulationen des peripheren Blutes erstellt werden. Ferner war eine genaue Analyse der TLR9-Expression nach Stimulation humaner B-Zellen möglich. In diesem Sinne ist es wichtig zu vermerken, dass die einzige dendritische Zelle, die ebenfalls in prominenten Mengen TLR9 und TLR7 exprimiert, die PDC darstellt⁷.

Die Ausstattung der PDCs mit diesen Toll-Like-Rezeptoren könnte dazu führen, dass es über eine Stimulation mit den korrespondierenden Agonisten zu einer Ausreifung der

PDC kommt und diese ihre funktionelle Rolle als Schaltstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort erfüllen kann⁴¹.

4.3.5 Differenzielle TLR-Expression in humanen B-Zell-Subpopulationen

In den letzten Jahren fand die Expression von PRRs auf B-Zellen besondere Beachtung, da neuere Studien zeigten, dass vor allem memory B-Zellen besser auf eine Stimulation mit CpG-ODN reagierten als naive B-Zellen. Es bestand also die Möglichkeit, dass die TLR-Expression in humanen naiven und memory B-Zellen unterschiedlich reguliert sein könnte¹²⁰. Basierend auf der unterschiedlichen Expression von CD27 und IgD auf humanen B-Zellen besteht das periphere Blut aus bis zu 60-70% CD27⁻ IgD⁺ naiven B-Zellen und 20-30% CD27⁺ IgD⁻ memory B-Zellen¹⁶⁹.

Bis heute ist wenig bekannt hinsichtlich der TLR-Regulation und dessen Einfluss auf das immunologische Antwortverhalten von B-Zell-Subpopulationen, insbesondere nach CpG-ODN und B-Zell-Rezeptor-Stimulation. In einer Studie von Lanzavecchia's Arbeitsgruppe wurde ein detailliertes TLR-Expressionsmuster der B-Zell-Subpopulationen skizziert und in einen funktionellen Zusammenhang mit CpG-Stimulation und B-Zell-Rezeptor-Aktivierung gebracht.

In Analogie zu Lanzavecchia's Studie konnte die hier vorgelegte Arbeit ein charakteristisches Expressionsmuster von TLRs in den B-Zell-Subpopulationen aufzeigen. Um reine B-Zell-Subpopulationen für die Analyse der TLR-Expression zu erhalten, wurden die B-Zellen mittels der sehr sensitiven Methode des "Zellsortens" gewonnen, bei der die Zellen eine Reinheit von über 95% aufwiesen. Im Anschluss wurden naive und memory B-Zellen mittels *real-time*-PCR auf deren TLR-Expression untersucht. So ließ sich in naiven B-Zellen eine geringere Expression von TLR9 und TLR10 nachweisen als in memory B-Zellen. Da TLR10 in prominenten Mengen nur in B-Zellen (vor allem memory B-Zellen) vorkommt, bietet die Identifikation eines TLR10-Liganden eine Möglichkeit, B-Zellen selektiv zu stimulieren ohne einen zusätzlichen Effekt auf MDCs oder PDCs auszuüben. TLR4 wurde nur marginal, aber ebenfalls höher in memory B-Zellen als in naiven B-Zellen exprimiert.

Bei Kenntnis dieser Ergebnisse ist es also sehr wahrscheinlich, dass die Expression von TLR9 in humanen B-Zellen von ihrem Entwicklungsstadium abhängt und somit unterschiedlich reguliert wird.

4.3.6 Effekte von BCR-Ligation und CpG-Stimulation auf die TLR-Expression von humanen B-Zellen

Auf Grund der Studie von Bernasconi¹²⁰ bestand die Möglichkeit, dass eine Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors auf humanen B-Zellen zu einer vermehrten TLR-Expression führen und somit die Funktion eines "Fine Tuners" für humane B-Zellen erfüllen könnte. Die B-Zellen wären somit befähigt, besser und spezifischer auf polyklonale Stimuli zu reagieren. Ferner hatten frühere Studien an Mäusen gezeigt, dass es einen Synergismus zwischen einer B-Zell-Rezeptor Aktivierung und gleichzeitiger TLR-Stimulation gibt^{174,202}.

Diese Studien schlagen vor, dass polyklonale Stimuli, wie z.B. CpG-DNA oder LPS, als eine Art "physiologische Brücke" zwischen B-Zell-Rezeptoren und TLRs fungieren und durch die Quervernetzung ("Crosslinking") dieser beiden Zell-Rezeptoren zu einer B-Zell-Proliferation und B-Zell-Differenzierung führen.

Wie bereits erwähnt, stellen optimale CpG-ODN-Sequenzen außerordentlich starke Mitogene für B-Zellen fast aller Vertebraten^{123, 132} dar. Schon geringe Konzentrationen CpG-DNA wirken synergistisch mit einem adäquaten B-Zell-Rezeptor Signal, um reife periphere B-Zellen zu einer mehr als 10-fachen Proliferation, Antigen-spezifischer Antikörpersekretion und IL-6-Produktion anzuregen¹³². In einer erst kürzlich erschienenen Studie konnte CpG-DNA als potentes Adjuvans naive und memory B-Zellen in Kombination mit CD40L, IL-2 und IL-10 zu Antikörper-produzierenden Zellen ausdifferenzieren lassen¹⁷⁰. In Analogie dazu konnte Bernasconi zeigen, dass TLR9 in naiven B-Zellen in sehr geringer Anzahl exprimiert wird und durch eine Aktivierung des B-Zell-Rezeptors mit Anti-Ig beträchtlich gesteigert werden kann. Memory B-Zellen hingegen besitzen hohe Mengen TLR9¹²⁰.

Konsequenterweise konnte die Arbeitsgruppe um Bernasconi nachweisen, dass memory B-Zellen nach CpG-Stimulation mit Proliferation und Differenzierung zur Antikörper-produzierenden Zellen reagierten, während naive B-Zellen die simultane Aktivierung

mittels Anti-Ig und CpG-ODN benötigten¹²⁰. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse konnte die Gruppe um Lanzavecchia ein immunologisches Modell postulieren, welches auf einer kurzfristigen Verbindung zwischen dem B-Zell-Rezeptor und dem TLR9-Liganden beruht:

1. In einem ersten Schritt bindet Antigen an den B-Zell-Rezeptor und löst die TLR9-Expression aus.
2. In einem zweiten Schritt wird das Antigen und der assoziierte TLR-Ligand in der Zelle internalisiert und in das endosomale Kompartiment aufgenommen, wo es mit neu synthetisiertem TLR9 interagiert.

Dieses Modell konnte noch dadurch verfeinert werden, dass die Proliferation und Differenzierung von naiven und memory B-Zellen ohne T-Zell-Hilfe induziert werden konnte. Die direkte Kopplung von Antigen an CpG-ODN ist demnach ausreichend, um eine T-Zell-unabhängige Immunantwort auszulösen.

Somit steht die in der hier vorgelegten Arbeit beschriebene Verminderung der TLR9-Expression humaner B-Zellen im Widerspruch zu den zitierten Autoren^{120, 150, 174, 176, 202}. So konnte nach simultaner Stimulation mit CpG und Anti-Ig eine Verringerung der mRNA-Expression von TLR9 in humanen B-Zellen nachgewiesen werden. Ferner führte die Titration humaner B-Zellen mit unterschiedlichen Mengen IFN- α zu einer verminderten Expression von TLR9. Infolgedessen konnte angenommen werden, dass eine TLR9-Hochregulation nicht für die verstärkte Immunantwort humaner B-Zellen verantwortlich war. Die Verringerung der TLR9-Expression bestätigte außerdem Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, bei der eine B-Zell-Stimulation mit CpG-ODN ebenfalls zu einer Verminderung der TLR9-Expression führte⁷.

Man muss allerdings erwähnen, dass die Ergebnisse der TLR9-Expression nach Stimulation humaner B-Zellen erzielt wurden, die *nicht* in ihre Untergruppen aufgetrennt waren. Ein weiterer wichtiger Unterschied bestand im Antwortverhalten der B-Zell-Subpopulationen nach CpG- und B-Zell-Rezeptor-Stimulation. So konnte die Plasmazelldifferenzierung von memory B-Zellen durch diesen Synergismus stärker gefördert werden als durch CpG-ODN alleine und dadurch auch zu der Bildung von Immunglobulinen (vor allem IgG) führen. In Übereinstimmung mit Bernasconi reicht die alleinige Stimulation naiver B-Zellen mit CpG-C nicht aus, um eine ausreichende

Plasmazelldifferenzierung und Immunglobulinproduktion einzuleiten, sondern man benötigt dazu die Stimulation des B-Zell-Rezeptors und die PDC. Im Gegensatz zu Bernasconi's Arbeit bedurfte jedoch die memory B-Zelle ebenfalls der Hilfe durch den B-Zell-Rezeptor und der Hilfe der PDC. Ferner stehen die Ergebnisse dieser Arbeit im Widerspruch zu Bernasconi's Hypothese, dass die selektive Expression der TLRs in memory B-Zellen einen bis heute ausstehenden Erklärungsmechanismus für das selektive Ansprechen von memory B-Zellen auf CpG-ODN liefert. So zeigte die hier vorliegende Arbeit, dass naive B-Zellen auf Stimulation mit CpG-C quantitativ mehr Zytokine (IL-6 und IL-10) als memory B-Zellen produzieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen den TLRs eine neue Rolle in der Immunantwort zu. In dendritischen Zellen fungieren TLRs als primäre Auslöser für dendritische Zellreifung und Zytokinproduktion und in diesem Sinne als Schaltstellen zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Im Gegensatz dazu scheinen die TLRs in humanen B-Zellen abhängig von B-Zell-Rezeptor-Stimulation und dem korrespondierenden TLR-Liganden zu sein. Die TLRs in humanen B-Zellen scheinen somit unterschiedliche Rollen bei der Initiation einer primären Immunantwort und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses zu spielen.

4.4 PDCs und CpG-ODN: Unterstützer einer polyklonalen oder Antigen-spezifischen Immunantwort ?

4.4.1 Mikrobielle DNA unterscheidet sich von CpG-DNA

B-Zellen waren die ersten humanen Immunzellen, von denen man wusste, dass sie CpG-Motive in mikrobieller DNA in einer CpG-spezifischen Art und Weise erkennen. Basierend auf B-Zell-Aktivierung und deren Proliferation wurde das menschliche CpG-Motiv identifiziert und ein Oligonukleotid entwickelt (CpG-B), welches die Signaltransduktionskaskade der MAP-Kinasen und eine NF- κ B-Translokation in aufgereinigten B-Zellen induzieren konnte. Außerdem zeigte sich, dass CpG-B (ODN 2006) ein potentes Adjuvans in Primaten darstellt, um die humorale Immunantwort zu fördern¹²³. Aber die wichtige Frage, ob CpG-Oligonukleotide auf die verschiedenen Entwicklungsstufen der B-Zell-Differenzierung Einfluss nehmen und ob sie in

Kombination mit anderen Stimuli eine polyklonale oder Antigen-spezifische Immunantwort fördern, blieb bis vor kurzem ungeklärt.

So sind verschiedene Studien durchgeführt worden, die sich mit der Stimulation von CpG-aktivierten B-Zellen in Kombination mit oder ohne Antigen beschäftigen^{170, 173}. Alle diese Studien beruhen auf dem Konzept, dass die Stimulation von B-Zellen mit CpG-ODN und Antigen ausreicht, um memory B-Zellen zu Plasmazellen ausreifen zu lassen.

In den erwähnten Studien reicht diese Art der B-Zell-Aktivierung aber nicht aus, um naive B-Zellen zu Plasmazellen ausdifferenzieren zu lassen, es sei denn ein zusätzlicher Stimulus ist verfügbar z.B. in Form von T-Zell-Hilfe (CD40L) oder Zytokinen (IL-2, IL-4 und IL-10).

Wie die vorliegende Arbeit beweist, können PDCs CpG-stimulierte naive B-Zellen via löslicher Faktoren und direktem Zell-Zell-Kontakt zu Plasmazellen ausdifferenzieren lassen und somit für die T-Zell-Hilfe substituieren. Jedoch gibt es nur limitierte Informationen, wie CpG-Motive innerhalb mikrobieller DNA von B-Zellen unter physiologischen Bedingungen erkannt werden, z.B. während einer bakteriellen oder einer Virusinfektion. Denn obwohl CpG-Oligonukleotide in der Lage sind, als ein *Mimikry* für bakterielle DNA zu fungieren, gibt es doch einige wichtige Unterschiede zwischen CpG-ODN und mikrobieller DNA:

1. Die Frequenz von CpG-Motiven in CpG-ODN ist höher.
2. Das chemische Rückgrat von CpG-ODN ist resistenter gegenüber dem Abbau durch Nukleasen.
3. Die molekulare Masse von CpG-ODN ist viel kleiner.

In diesem Sinne konnte gezeigt werden, dass CpG-B in Kombination mit CD40L ebenso wie *Escherichia Coli*-DNA als physiologischer Stimulus zu einer Aktivierung von humanen B-Zellen führen kann²⁰¹.

Ferner ist bekannt, dass die Präsenz von CpG-ODN in zu hoher Konzentration zu einer polyklonalen B-Zell-Stimulation führt¹⁵⁰. Man muss sich allerdings auch fragen, ob CpG-Oligonukleotide überhaupt so hohe Konzentrationen im extrazellulären Raum der

lymphatischen Gewebe erreichen könnten, um B-Zellen zu stimulieren. Dies könnte jedoch der Fall sein während schwerwiegender Infektionen wie z.B. einer Sepsis. Im Gegensatz dazu würden Nukleasen während einer begrenzten Infektion durch die Aufspaltung der mikrobiellen DNA das Entstehen einer polyklonalen Aktivierung humaner B-Zellen verhindern. Es gibt jedoch neuere Hinweise, dass in DNA-haltigen Immunkomplexen die DNA vor der Aufspaltung durch Nukleasen geschützt ist. DNA scheint also gegenüber dem Abbau durch Nukleasen stabiler zu sein, wenn sie mit Nukleinsäure-Protein-Partikeln komplexiert ist.

Leadbetter konnte sogar erste Hinweise am Mausmodell liefern, dass autoreaktive B-Zellen über ihren B-Zell-Rezeptor, der spezifisch für eigens produziertes IgG ist, über DNA-haltige Immunkomplexe aktiviert werden können. Dies scheint über einen MyD88-abhängigen Mechanismus zu funktionieren und beinhaltet somit TLR9¹⁷⁴. Die Arbeitsgruppe um Leadbetter fand auch heraus, dass für die Aktivierung der B-Zellen die simultane Stimulation des B-Zell-Rezeptors über Antigen und die Aktivierung von TLR9 über die DNA-haltigen Immunkomplexe erforderlich ist¹⁷⁴.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Immunkomplexe oder ähnliche Partikel, die mikrobielle DNA beinhalten, zusammen mit viralen oder bakteriellen Antigenen fähig sein könnten, B-Zellen zu aktivieren, die den korrespondierenden B-Zell-Rezeptor besitzen. In der hier vorliegenden Arbeit wird exakt der zuvor beschriebene Mechanismus überprüft und größtenteils bestätigt. So führte die Stimulation von humanen B-Zellen mit CpG-DNA als TLR9-Ligand und die Stimulation des B-Zell-Rezeptors mit Anti-Ig, welches den B-Zell-Rezeptor quervernetzt und somit Antigen "simuliert" zu einer verstärkten Immunantwort der B-Zellen.

Dies förderte vor allem die Zytokinproduktion, insbesondere von IL-6 und IL-10. Interessanterweise wurde vor allen Dingen auch die Zytokinausschüttung von naiven B-Zellen gefördert, obwohl in der hier durchgeführten Arbeit gezeigt werden konnte, dass diese ein niedrigeres TLR9-Profil aufweisen als memory-B-Zellen.

Ebenso förderte dieser Synergismus die Plasmazellbildung von naiven und memory B-Zellen und führte dadurch auch zur vermehrten Bildung von Immunglobulinen (IgM und IgG).

In Übereinstimmung mit Bernasconi und Leadbetter lässt sich also die Hypothese aufstellen, dass die Stimulation von B-Zellen über ihren B-Zell-Rezeptor und CpG-DNA ausreicht, um eine potente Immunantwort ohne T-Zell-Hilfe auszulösen. Darüber hinaus konnte die hier vorliegende Arbeit zeigen, dass durch die Zugabe der PDC zu humanen B-Zellen dieser Synergismus um ein Vielfaches verstärkt werden kann. In diesem Sinne besteht natürlich die Gefahr, dass diese Aktivierungssteigerung zu einer polyklonalen Aktivierung humaner B-Zellen führt. Leadbetter zeigt jedoch, dass die gleichzeitige Stimulation des B-Zell-Rezeptors via Antigen und die gleichzeitige Aktivierung von TLR9 über die DNA-haltigen Immunkomplexe die Immunantwort von B-Zellen restringieren kann¹⁷⁴. So *müssen* die B-Zellen ihr korrespondierendes Antigen erkennen, was als eine Art Schutzmechanismus fungiert und somit eine polyklonale Aktivierung von B-Zellen verhindert. Daher werden durch diesen Schutzmechanismus vermutlich nur Antigen-spezifische B-Zellen aktiviert.

Polyklonale Stimulation von B-Zellen ohne spezifisches Antigen ist vielleicht nützlich, um memory B-Zellen zu aktivieren und somit ein immunologisches Gedächtnis in einer Antigen-unspezifischen Art und Weise aufrecht zu erhalten. Die Fähigkeit von CpG-ODN, eine polyklonale B-Zell-Aktivierung in der Abwesenheit von Antigen auszulösen, ist vor allem im Hinblick auf die Eigenschaft von CpG-ODN als potentielles humorales Vakkzineadjuvans von Interesse. So könnte es also nützlich sein eine Antigen-unspezifische Immunantwort auszulösen. Im Gegensatz dazu könnte die Kombination von CpG-C und Anti-Ig oder "spezifischem" Antigen zu einer Antigen-spezifischen Immunantwort führen, welche durch die PDC noch weiter verstärkt werden kann und die T-Zell-Hilfe nicht benötigt.

4.5 Das neue CpG-C-Oligonukleotid

4.5.1 Drei verschiedene CpG-Klassen: charakterisiert durch ihre primären Zielzellen

Im Vergleich unterschiedlicher CpG-ODNs konzentrierte sich diese Arbeit darauf, die Funktion eines erst kürzlich von unserer Arbeitsgruppe identifizierten neuen Oligonukleotids (CpG-C)¹⁵³ bezüglich der Aktivierung von Effektorzellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort weiter zu charakterisieren. Die hierbei beobachteten

Effekte der neuen CpG-Klasse lassen sich sowohl auf eine direkte Stimulation von B-Zellen und PDCs als auch auf indirekte Effekte, z.B. mittels Zytokinen zurückführen. Für die direkte Aktivierung der PDCs und der B-Zellen gibt es die einfache Erklärung, dass PDCs und B-Zellen auf Grund ihrer exklusiven Expression von TLR9 mit großer Sicherheit die primären Zielzellen für CpG-ODN in humanen PBMCs darstellen.

In diesem Sinne ist es sehr wichtig, nochmals darauf hinzuweisen, dass die Definition verschiedener Klassen von CpG-Oligonukleotiden auf der spezifischen Reaktion verschiedener Subpopulationen von Immunzellen basiert, die in der Lage sind, CpG-Motive zu erkennen und auch den entsprechenden Rezeptor (TLR9) besitzen. Eine Klassen-Einteilung der CpG-ODNs in CpG-A und CpG-B oder nun auch CpG-C anhand dieser primären Zielzellen, wie von Arthur Krieg und unserer Arbeitsgruppe propagiert erscheint somit sinnvoll.

Das Phänomen der unterschiedlichen CpG-Klassen beinhaltet zwei voneinander abgrenzbare Komponenten. Die unterschiedlichen biologischen Profile der zwei CpG-Klassen sind einerseits bedingt durch das unterschiedliche immunologische Repertoire der B-Zelle und der PDC, hervorgerufen durch den identischen TLR9-Agonisten CpG-DNA, andererseits durch die vermeintlich präferenzielle Aktivierung dieser beider Zielzellen durch CpG-A, CpG-B oder CpG-C. Die genaue Charakterisierung der neuen CpG-Klasse im Hinblick auf die Aktivierung ihrer primären Zielzellen wirft jedoch folgende entscheidende Fragen auf: Wieso kann CpG-C selektiv sowohl PDCs als auch B-Zellen stimulieren? Die folgenden Punkte sollen mögliche Erklärungsansätze liefern:

4.5.2 Nur CpG-B stimuliert die B-Zelle

Die Notwendigkeit von TLR9 in der Erkennung unterschiedlicher CpG-Klassen wurde erst kürzlich unter Beweis gestellt. Akira und Mitarbeiter konnten eindeutig belegen, dass TLR9-defiziente Mäuse weder durch CpG-A noch durch CpG-B stimuliert werden können²⁰³. Dass diese Beobachtung jedoch nicht den Umkehrschluss zulässt, dass die Expression von TLR9 hinreichend ist, um auf CpG-DNA-Stimulation zu reagieren, zeigen andere Ergebnisse. So reagieren aufgereinigte B-Zellen trotz eindeutiger TLR9-Expression nicht auf CpG-A-Stimulation¹⁵³. Auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass B-Zellen vorwiegend durch CpG-B aktiviert werden^{120, 152, 170}. Weiterhin zei-

gen Untersuchungen mit TLR9-exprimierenden Zelllinien, dass diese lediglich durch ODNs der Kategorie CpG-B stimuliert werden können, während CpG-A keine Effekte zeigt¹⁵². Diese Daten legen nahe, dass neben TLR9 zusätzliche Faktoren notwendig sind, um auf ODNs der Kategorie CpG-A zu reagieren. Womöglich sind diese Faktoren für die selektive Aktivierung von PDCs durch CpG-A verantwortlich.

4.5.3 CpG-A und CpG-B induzieren eine qualitativ unterschiedliche Antwort der PDC

Die deutlich höhere Induktion von IFN Typ I durch CpG-A im Vergleich zu CpG-B in PDCs suggeriert einen rein quantitativen Unterschied in der stimulatorischen Fähigkeit der beiden CpG-Klassen. Verblüffenderweise haben Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass CpG-B in der Induktion zahlreicher DC-typischer Aktivitätsmarker CpG-A jedoch deutlich überlegen ist, so dass man eher von qualitativ unterschiedlichen Aktivitätsprofilen sprechen muss. CpG-B induziert eine deutlich höhere Expression von kostimulatorischen Molekülen und Produktion von proinflammatorischen Mediatoren in PDCs als CpG-A^{72, 204}. Auch zeigen sich deutliche Unterschiede in den Mechanismen der IFN Typ I-Induktion zwischen den beiden ODN-Klassen. So wird lediglich durch CpG-A ein positiver Rückkopplungsmechanismus benutzt, der die Interferonproduktion entscheidend amplifiziert.

4.5.4 CpG-C aktiviert B-Zelle und PDC

Die erst kürzlich von unserer Arbeitsgruppe identifizierten neuen Oligonukleotide (CpG-C)¹⁵³ erwiesen sich im Vergleich mit CpG-A und CpG-B wesentlich potenter in der Aktivierung von B-Zellen innerhalb von PBMCs. So führte CpG-C zu einer verstärkten Expression des Oberflächenmarkers CD86 auf B-Zellen und einer verstärkten IL-6-Produktion innerhalb von PBMCs. Zusätzlich erwies sich CpG-C im direkten Vergleich mit CpG-B als effizienter bezüglich der IFN- α Induktion in PBMCs. Die Depletion der PDC von PBMCs machte deutlich, dass die verbesserte Aktivierung von B-Zellen sowohl über eine direkte aber auch indirekte Aktivierung über PDCs erklärt werden kann. Konsequenterweise erwies sich CpG-C also besser als CpG-A (fehlende direkte B-Zell-Aktivierung) bezüglich der Aktivierung von humanen B-Zellen und besser als CpG-B (schwache Induktion von IFN- α in PDCs) in der Aktivierung von PDCs. In

Analogie zu diesen Ergebnissen wurden die Unterschiede noch deutlicher, wenn isolierte B-Zellen jeweils einzeln mit CpG-C, CpG-B oder CpG-A stimuliert und auf IL-6-Produktion untersucht wurden. Wie erwartet, induzierte CpG-A kein IL-6. CpG-C hingegen übertraf CpG-B bezüglich der IL-6-Produktion. Durch die Zugabe von PDCs zu diesen Zellkulturen ließ sich dieser Effekt noch steigern. Folglich ließen diese Ergebnisse auf eine funktionelle Kooperation von B-Zellen und PDCs schließen.

Die Identifikation dieser neuen CpG-Klasse stellte den ersten Versuch dar, ein Oligonukleotid zu entwickeln, das beide TLR9-tragenden humanen Immunzellen, PDCs und B-Zellen, gleichzeitig aktiviert und miteinander in Verbindung bringt. Das in der hier vorgelegten Arbeit benutzte CpG-C konnte die oben erwähnten Ergebnisse nicht nur bestätigen, sondern auch die Funktion dieser neuen CpG-Oligonukleotide bezüglich der B-Zell-PDC-Interaktion genauer charakterisieren. So förderte CpG-C in humanen B-Zellen vor allem in Kombination mit Antigen (Anti-Ig) eine gesteigerte Expression von Oberflächenmarkern (CD86) und die Zytokinsynthese (IL-6, IL-10, TNF- α). Über die direkte Induktion von IFN- α in PDCs konnte diese simultan mit CpG-C und Anti-Ig zu einer noch stärkeren B-Zell-Stimulation führen. In Analogie dazu ließen sich antigenerfahrene B-Zellen durch CpG-C zu einer erhöhten Plasmazelldifferenzierungsrate und erhöhter Immunglobulinproduktion anregen. Ein "Isotype Switch" von naiven B-Zellen wurde in dieser Arbeit durch CpG-C jedoch nicht erreicht. Diese drei Gruppen von CpG-ODN repräsentieren jedoch nur einen Bruchteil möglicher CpG-ODN-Sequenzen mit unterschiedlichen funktionellen Aufgaben. Es existieren vielleicht andere Sequenzen, die ausschließlich B-Zellen aktivieren oder sich in ihrer Fähigkeit unterscheiden, die B-Zell-Differenzierung voranzutreiben. Es ist also grundsätzlich denkbar, dass Unterschiede in Aufnahme, Prozessierung und/oder Bindung an den TLR9-Rezeptor für die differierenden biologischen Aktivitäten der drei CpG-ODN Klassen verantwortlich sind.

4.5.5 Strukturelle Unterschiede der drei CpG-Klassen

Nach Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe spielen möglicherweise strukturelle Eigenschaften, die sich auf ODN-Rückgrat, CpG-Motiv als auch Vorhandensein von Poly-G-Motiven beziehen, und die Ausbildung von Quartärstrukturen eine entscheidende Rolle in der unterschiedlichen Wirkung der CpG-Klassen. Bezüglich der neuen Gruppe von

CpG-C-Oligonukleotiden ist auffällig, dass sie eine zentrale Palindromsequenz teilen, welche aus CG-Dinukleotiden besteht und ein TCGTCG-Motiv am 5'Ende besitzt. Das Sequenzmotiv am 3'Ende scheint von untergeordneter Bedeutung zu sein. Die neue Gruppe von CpG-ODN könnte somit als eine Mischung aus CpG-B und CpG-A beschrieben werden, da es die zentrale Palindromsequenz des CpG-A und das "optimale humane CpG-Motiv" TCGTCG-Motiv des CpG-B-ODN am 5'Ende besitzt^{6,123}.

Die Fähigkeit der gleichzeitigen Stimulation von B-Zellen und PDCs könnte also in einer anderen Sequenz der neuen Oligonukleotide liegen, welche eine zentrale palindromische Sequenz mit CG-haltigen Dinukleotiden und ein TCGTCG-Motiv am 5'Ende aufweisen. Ein weiterer wichtiger Vorteil der neuen CpG-C-ODN ist der Bezug auf die klinische Anwendung *in vivo*. Dadurch, dass die neuen CpG-ODN als chemisches Rückgrat ein komplettes Phosphorothioat enthalten, zeichnen sie sich durch eine bessere Resistenz gegenüber Gewebsnukleasen aus als CpG-A, was die *in vivo* Anwendung für diese neue Klasse von Oligonukleotiden natürlich noch praktischer macht.

4.5.6 Unterschiede in der Aufnahme der drei CpG-Klassen

Ein attraktives Erklärungsmodell wäre eine jeweils bevorzugte Aufnahme der verschiedenen CpG-Klassen in ihre korrespondierenden Zielzellen. Schon länger ist jedoch bekannt, dass Bindung und Aufnahme von ODNs unabhängig von ihrer immunstimulatorischen Wirkung stattfinden, wobei ODNs mit Poly-G-Abschnitten eine verstärkte Bindung und Aufnahme zeigen¹³¹. In einer kürzlich erschienenen Studie wurden Bindung und Aufnahme von CpG-A und CpG-B in primären B-Zellen untersucht¹⁵². Obwohl sich hierbei eine verstärkte Bindung und Aufnahme von CpG-A in B-Zellen zeigte, wurde jedoch keine direkte Aktivierung von B-Zellen beobachtet. Eine verminderte Aufnahme von CpG-A-ODN in B-Zellen kann somit nicht für das fehlende Ansprechen auf diese CpG-Klasse verantwortlich gemacht werden. Obwohl die Präsenz von TLR9 für die Erkennung und Aktivierung von Immunzellen mittels CpG erforderlich zu sein scheint, so scheint das Vorhandensein von TLR9 nicht ausreichend zu sein, um CpG-Motive in unterschiedlichen DNA-Sequenzen zu erkennen. Vermutlich sind noch zusätzliche Adaptormoleküle in die Regulation der Bindung der CpG-Motive an TLR9 eingeschaltet. Solche Adaptormoleküle könnten in B-Zellen und PDCs unterschiedlich exprimiert sein und werden wahrscheinlich während der Differenzierung

unterschiedlich reguliert. In diesem Zusammenhang ist es wahrscheinlich, dass die Ergebnisse, die von TLR9-transfizierten Zelllinien erzielt werden, möglicherweise durch das Fehlen eben dieser Adaptormoleküle verfälscht werden.

In diesem Zusammenhang sind Mikroskopie-Studien der Arbeitsgruppe um Klinman von Interesse, in denen gezeigt wird, dass die ODN-Klassen in unterschiedliche subzelluläre Kompartimente aufgenommen werden können¹⁵². Möglicherweise kommt es ausgehend von diesen unterschiedlichen Kompartimenten zur Initiation von differierenden Signaltransduktionsmechanismen. Zukünftige Studien werden zeigen, ob in der Tat eine unterschiedliche subzelluläre "Adressierung" von CpG-Klassen für die beobachteten Klassenunterschiede verantwortlich gemacht werden kann.

4.6 Klinische Relevanz der Ergebnisse

4.6.1 Von Maus zu Mensch

Die Effektivität von CpG-DNA als Adjuvans einer humoralen Immunantwort ist inzwischen durch erste klinische Studien am Menschen gut belegt. Bisher existieren jedoch wenige Daten, die belegen, dass CpG-ODN beim Menschen eine zelluläre Immunantwort verbessern können. Diese Arbeit zeigt jedoch, dass zumindest in einem *in vitro*-Modell CpG-DNA auch beim Menschen ein potentes Adjuvans für die Induktion einer humoralen Immunantwort ist, und macht Hoffnung, dass CpG-ODN auch zu diesem Zweck erfolgreich in klinischen Studien eingesetzt werden können. Neben der für das murine und humane System beschriebenen Spezifität in der Erkennung von CpG-Motiven durch TLR9 scheint sich das Expressionsmuster von TLR9 im murinen und humanen System wesentlich zu unterscheiden^{6, 7}. Während im humanen System lediglich PDCs und B-Zellen eine nennenswerte TLR9-Expression aufweisen und somit direkt auf CpG-DNA reagieren, werden im murinen Immunsystem auch Zellen myeloider Ursprungs direkt durch CpG-DNA aktiviert^{137, 138}. Auch wenn das murine Pendant zur PDC ähnlich auf den TLR9-Agonisten CpG reagiert, so zeigen sich doch deutliche Unterschiede in der Reaktionsweise muriner myeloider APCs auf CpG-Stimulation. Bei diesen Zellen führt Aktivierung mittels TLR9 zu einer nachhaltigen Produktion von IL-12 und sukzessive zu einer effektiven T_H1-Immunantwort. Nennenswerte IL-12-Level werden im humanen System auf alleinige CpG-Stimulation nicht beobachtet. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Hauptwirkung des TLR-Agonisten CpG in der In-

duktion einer spezifischen Immunantwort im murinen System über Zellen der myeloiden Stammreihe vermittelt wird, die im humanen System jedoch nicht auf CpG reagieren. Ein wichtiger Schritt in der Übertragung der CpG-Technologie von der Grundlagenforschung in die Klinik wird es somit einerseits sein, optimale humane CpG-ODNs zu identifizieren, und andererseits, in geeigneten Modellen deren Wirkprofil zu charakterisieren. Das Hauptaugenmerk in der Erprobung des Impfadjuvans CpG-DNA im Tierversuch sollte hierbei sinnvollerweise auf die Zielzellen und nicht auf das Vakzinierungsergebnis alleine gelegt werden. Um Spezies-bedingte Unterschiede in der TLR9-Expression zu umgehen, wäre es ein interessanter Ansatz, humane CpG-Motive in Mäusen mit humanisiertem Immunsystem (Hu-PBMC-SCID Mice) zu untersuchen.

4.6.2 Klinische Bedeutung der unterschiedlichen Klassen

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit wäre der rationale Einsatz einer bestimmten CpG-Klasse in Abhängigkeit vom gewünschten Impfeffekt von immenser Wichtigkeit. CpG-C wäre das überlegenere Adjuvans in einer Vakzinierungsstrategie, die darauf abzielt, eine primäre Immunantwort zu induzieren. Eine Frage, der vor allem im Hinblick auf die Vakzinierung mit dem neuen CpG-C nachgegangen werden muss, ist, ob die unkontrollierte Produktion von IFN- α bei Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) die Konsequenz einer permanenten Stimulation durch Viren, Immunkomplexe oder anderer mikrobieller Stimuli ist. In diesem Sinne ist neben der neuen Klasse von CpG-C-Oligonukleotiden CpG-A ein potentieller Kandidat für selektive IFN- α -Induktion in PDCs ohne die B-Zell-Funktion zu unterstützen. CpG-B hingegen könnte eingesetzt werden, um unerwünschte Nebenwirkungen, die unter einer IFN- α -Therapie vorkommen, zu vermeiden.

4.6.3 TLR9-Inhibition als möglicher Mechanismus zur Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen

Neben den viel versprechenden Einsätzen von CpG-DNA in der Immuntherapie (siehe Einleitung) wurde in letzter Zeit häufiger eine Beteiligung von TLR9 bei der Entstehung von Autoimmunität diskutiert²⁰⁵. Diesbezüglich muss eine klare Unterscheidung zwischen synthetischer CpG-DNA und DNA-enthaltenden Immunkomplexen gemacht

werden. In den klinischen Studien, die derzeit mit CpG-DNA durchgeführt werden, gab es zu keinem Zeitpunkt Hinweise auf die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung. Jedoch kann die Entstehung von Autoantikörpern durch Immunkomplexe, die mit körpereigener DNA verkomplexiert sind, begünstigt werden¹⁷⁴. So scheint es, dass eine Aktivierung von B-Zellen über TLR9 sogar mit DNA-Sequenzen möglich ist, die normalerweise keinen immunstimulatorischen Effekt auf B-Zellen ausüben. Voraussetzung ist jedoch, dass die betroffenen B-Zellen vorher einen starken Stimulus über ihren B-Zell-Rezeptor erfahren haben^{173, 205, 206}.

Dieses Phänomen erklärt vielleicht auch, warum CpG-DNA keine Autoimmunität induziert, wenn es nicht in Form von Immunkomplexen vorliegt. Da aber eine TLR9-Beteiligung trotzdem eine tragende Rolle in der Pathogenese von bestimmten Autoimmunerkrankungen, wie etwa dem SLE zu spielen scheint, stellen Wege zur Inhibition einer TLR9-vermittelten Immunantwort wirksame therapeutische Strategien dar^{135, 137, 174, 207-209}. Solche Inhibitoren schließen das Antimalaria-Mittel Chloroquin und bestimmte suppressiv wirkende Oligonukleotide ein.

Die Existenz bestimmter suppressiver DNA-Motive, die selektiv die Immunantwort über TLR9 blockieren, erklärt auch das Ausbleiben einer Immunantwort nach Stimulation mit Vertebraten-DNA²¹⁰. Antimalaria-Mittel, die schon seit Dekaden in der Therapie von SLE eingesetzt werden, wirken möglicherweise über eine Inhibition der TLR9-Signaltransduktionskaskade. Somit stellen suppressiv wirkende DNA-Sequenzen mögliche Therapeutika bei Autoimmunität dar^{174, 211}.

4.6.4 Die Rolle der PDC und IFN- α bei Autoimmunerkrankungen

Tatsächlich konnte in einigen Arbeiten gezeigt werden, dass PDCs eine Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, insbesondere dem Systemischen Lupus Erythematoses, spielen²¹².

So konnte gezeigt werden, dass Monozyten sich im Blut von SLE-Patienten wie dendritische Zellen verhalten und in der Lage sind, apoptotische Zellen aufzunehmen und Antigen an autologe T-Zellen zu präsentieren.

In der Tat ließen sich normale Monozyten (d.h. Monozyten aus den Seren gesunder Spender) mit Seren einiger SLE-Patienten *in vitro* zu myeloiden DCs ausreifen⁴⁷.

Konsequenterweise stellte sich die Frage, welche Zytokine für diese Ausreifung verantwortlich sein könnten. Es stellte sich heraus, dass die DC-induzierende Aktivität über IFN- α vermittelt wird und mit der Höhe der IFN- α -Werte im Serum von SLE-Patienten stark korreliert⁴⁷. Die Quelle dieses IFN- α ist die PDC. Erstaunlicherweise ist die Anzahl von PDCs im Blut von SLE-Patienten im Vergleich zu einem gesunden Menschen auf weniger als 70% herabgesetzt. Trotzdem produzieren die PDCs in Lupuspatienten genauso viel IFN- α wie ein gesunder Mensch nach einer viralen Infektion. SLE scheint also eine Krankheit zu sein, in der ein Ungleichgewicht zwischen den verschiedenen DC-Subpopulationen herrscht.

So kann man ein Modell postulieren, welches die Interaktion zwischen den verschiedenen DC-Subpopulationen veranschaulicht.

In diesem Modell induziert die Sezernierung von IFN- α die Ausreifung von Monozyten zu dendritischen Zellen. Diese Zellen nehmen apoptotische Zellen und Nukleosomen auf, die in großen Mengen in SLE-Blut vorhanden sind^{213, 214}. Diese nun antigenbeladenen DCs werden immer weiter durch IFN- α aktiviert und fangen schließlich an, körpereigene Antigene an autoreaktive B- und T-Zellen zu präsentieren. Als Zusammenfassung dieses Modells dient **Abbildung 4.6**.

Diese "ménage à trois" generiert eine hohe Anzahl an Plasmazellen, die Autoantikörper produzieren, welche wiederum Immunkomplexe bilden, die die IFN- α -Produktion weiter unterhalten können.

So konnte gezeigt werden, dass von der PDC produziertes IFN- α in Lupuspatienten durch eine Kombination von Immunglobulinen mit plasmid-DNA oder apoptotischen Zellen ausgelöst wird²¹⁵.

Ferner erklären die hohen Mengen an IFN- α die T- und B-Zell-Lymphopenie, da die experimentelle Anwendung von IFN- α in neugeborenen Mäusen zu einer 80% Reduktion von B-Zellen und T-Zellen führt.

Die Rolle von IFN- α in der Pathogenese von SLE wird durch folgende Punkte weiter untermauert:

1. Durch den beschleunigten Nierenschaden in Mäusen, denen Typ I Interferon injiziert wurde ²¹⁶ und 2. durch die Entwicklung hoch-affiner Antikörper, die gegen doppelsträngige DNA gerichtet sind (8% der Fälle) und 3. durch die Entwicklung von SLE (0.15%-0.7%) in Patienten, die mit IFN- α behandelt wurden (malignes Melanom, Hepatitis) ²¹⁷.

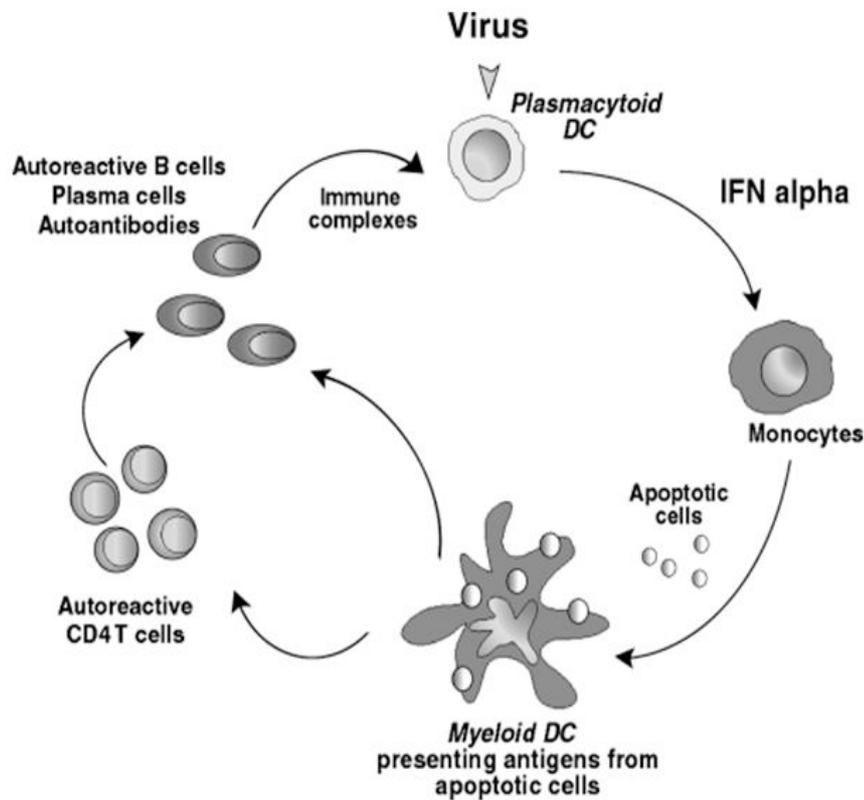


Abbildung 4.6 Die zentrale Rolle von DC-Subpopulationen in der Pathogenese von SLE

PDCs setzen hohe Mengen IFN- α , ausgelöst durch Viren, CpG, Immunkomplexe oder andere mikrobielle Stimuli, frei. Dieses lässt Monozyten in DCs ausdifferenzieren, die in der Lage sind, zirkulierende apoptotische Zellen aufzunehmen. Auf Grund der IFN- α -induzierten Reifung können diese DCs körpereigene Antigene an autoreaktive CD4-T-Zellen präsentieren. Außerdem unterstützen diese DCs zusätzlich B-Zell-Proliferation und Differenzierung. Solch eine “ménage à trois” generiert eine hohe Anzahl an Plasmazellen, die viele Autoantikörper sezernieren können. Diese Autoantikörper binden an zirkulierende Nukleosomen und bilden so Immunkomplexe, die die IFN- α -Produktion der PDCs aufrechterhalten (Palucka, A et al. The interplay of dendritic cell subsets in systemic lupus erythematosus, *Immunology and Cell Biology* 2002; (80): p. 484-488).

5. Zusammenfassung

Dendritische Zellen, T-Zellen und B-Zellen sind die Hauptakteure des menschlichen Immunsystems. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war man der Überzeugung, dass eine Aktivierung von B-Zellen durch Proteinantigene nicht nur die Stimulation des B-Zell-Rezeptors erfordert, sondern auch eine gleichzeitige Wechselwirkung mit Antigen-spezifischen T-Helferzellen. Erst neuere Erkenntnisse in der B-Zell-Biologie weisen darauf hin, dass die Aktivität spezifischer Subtypen von B-Zellen auch ohne T-Zell-Hilfe reguliert werden kann, denn wie andere Antigen-präsentierende Zellen exprimieren auch humane B-Zellen Toll-Like-Rezeptoren (TLRs).

Die Familie der TLRs repräsentiert eine Rezeptorgruppe, die in der Lage ist, eine große Vielfalt von mikrobiellen Molekülen, die "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs), zu detektieren. Humane B-Zellen exprimieren nur eine bestimmte Zahl von TLRs einschließlich TLR9.

Natürliche Liganden für TLR9 sind CpG-Motive in mikrobieller DNA. CpG-Motive sind nichtmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide mit bestimmten flankierenden Basensequenzen. Synthetische Oligonukleotide, die solche CpG-Motive enthalten, imitieren die Anwesenheit von mikrobieller DNA und induzieren ein charakteristisches Aktivierungsmuster von Immunzellen.

Neben der B-Zelle exprimiert im humanen System nur die plasmazytoide dendritische Zelle (PDC) TLR9. Diese Zelle ist charakterisiert durch die hohe Produktion von Typ I Interferonen (IFN- α und IFN- β) als Antwort auf eine Virusinfektion. CpG-DNA stellt ein einzigartiges mikrobielles Molekül dar, welches zu einer starken Aktivierung und Reifung der PDCs führt. Es wurden bisher unterschiedliche Klassen von CpG-Oligonukleotiden identifiziert: CpG-A (Prototyp ODN 2216) induziert hohe Mengen an IFN- α in PDCs, CpG-B (Prototyp ODN 2006) führt vorwiegend zur Aktivierung von B-Zellen. Erst kürzlich wurde ein weiteres CpG-ODN entwickelt (CpG-C oder M352), welches die Fähigkeit besitzt, hohe Mengen an IFN- α in PDCs zu induzieren, und gleichzeitig direkt B-Zellen aktiviert.

Gegenstand vorliegender Arbeit war somit die Analyse einer funktionellen Kooperation der beiden TLR9-tragenden Immunzellen, B-Zellen und PDCs und eine genaue Charakterisierung der immunstimulatorischen Effekte der neuen CpG-Klasse (CPG-C). Ferner sollte in diesem System die Funktion von TLR9 in humanen B-Zellen genauer dargestellt werden. Im Hinblick auf den möglichen klinischen Einsatz immunstimulatorischer DNA als Adjuvans einer therapeutischen Vakzine, wurde das Augenmerk insbesondere auf die Möglichkeit einer Induktion der humoralen Immunantwort gelegt. Anhand ausgewählter immunologischer Parameter sollte ein *in vitro*-Modell etabliert werden, um die Effekte von CpG-C und PDCs bezüglich ihrer kostimulatorischen Wirkungen auf die humorale Immunantwort hin zu untersuchen. Dabei wurde ein breites Spektrum an immunologischen und molekularbiologischen Techniken eingesetzt. Hierzu zählen die Isolation und Zellkultur von primären Immunzellen, die Bestimmung der Protein-Expression im ELISA, die vier-Farben-Durchflusszytometrie, autologe Stimulations-Assays, der Einsatz von Transwell-Experimenten, die Präparation von cDNA und die *real-time*-PCR

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit weisen auf eine neue Rolle von PDCs in der Regulation der humoralen Immunantwort hin. Diese neue biologische Funktion der PDCs besteht demnach in der Fähigkeit, eine T-Zell-unabhängige Entwicklung des humanen B-Lymphozyten zur Antikörper-produzierenden Zelle einzuleiten. Wie gezeigt kann dieser funktionelle Synergismus von PDCs und B-Zellen vor allem durch eine Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors mittels Anti-Ig und gleichzeitiger Stimulation durch den TLR9-Liganden CpG-C verstärkt werden. So bewirkte CpG-C, einer Virusinfektion vergleichbar, eine massive Induktion von IFN Typ I in PDCs. Über die Induktion von IFN- α in PDCs kam es zu einer noch stärkeren indirekten Aktivierung humaner B-Zellen. In Analogie dazu ließen sich antigenerfahrene B-Zellen direkt durch CpG-C zu einer erhöhten Plasmazelldifferenzierungsrate und erhöhter Immunglobulinproduktion stimulieren. Ein "Isotype Switch" von naiven B-Zellen wurde durch CpG-C jedoch nicht erreicht.

Auf der Suche nach dem Mechanismus wurde deutlich, dass die funktionelle Einheit zwischen B-Zellen und PDCs vor allem auf unterschiedliche lösliche Faktoren, größtenteils IFN- α , zurückzuführen war. Diese Untersuchungen zeigten jedoch ebenfalls, dass

auch ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen B-Zellen und PDCs für die verstärkte Aktivierung humaner B-Zellen verantwortlich sein könnte. Ferner konnten weitere Untersuchungen belegen, dass eine erhöhte TLR9-Expression nicht an der verstärkten Aktivierung von humanen B-Zellen beteiligt war.

Für die Analyse der TLR-Expression reiner B-Zell-Subpopulationen, wurden die B-Zellen mittels der sehr sensitiven Methode des "Zellsortens" gewonnen und im Anschluss mittels *real-time*-PCR auf deren TLR-Expression untersucht. So ließ sich in naiven B-Zellen eine geringere TLR9-Expression nachweisen als in memory B-Zellen. Bei Kenntnis dieser Ergebnisse ist es also sehr wahrscheinlich, dass die Expression von TLR9 in humanen B-Zellen von ihrem Entwicklungsstadium abhängt und somit unterschiedlich reguliert wird. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten korrelierte die native TLR9-Expression nicht mit dem immunologischen Antwortverhalten der B-Zell-Subpopulationen. So bedurfte die memory B-Zelle trotz ihrer prominenten TLR9-Expression ebenfalls die Hilfe durch den B-Zell-Rezeptor und die Hilfe der PDC, um einen Plasmazellphänotyp anzunehmen. Ferner stellen die Ergebnisse dieser Arbeit andere Arbeiten in Frage, die postulieren, dass eine gegenüber naiven B-Zellen höhere Expression von TLR9 in memory B-Zellen mit einem vermehrten Ansprechen auf CpG-Stimulation korreliert. So zeigt die hier vorliegende Arbeit, dass naive B-Zellen auf Stimulation mit CpG-C quantitativ mehr Zytokine (IL-6 und IL-10) als memory B-Zellen produzieren.

Die Fähigkeit von CpG-ODN eine polyklonale B-Zell-Aktivierung in der Abwesenheit von Antigen auszulösen, ist vor allem im Hinblick für den Einsatz von CpG als potentielles humorales Vakkzineadjuvans von Interesse. Die Kombination von CpG-C und Anti-Ig oder "spezifischem" Antigen könnte zu einer Antigen-spezifischen Immunantwort führen, welche durch die PDC noch weiter verstärkt werden kann und T-Zell-Hilfe nicht benötigt. Dennoch sollte bei all den Vorzügen, die CpG-C zu bieten hat, nicht vergessen werden, dass auch Autoimmunerkrankungen auftreten können. Diesbezüglich stellen suppressiv wirkende DNA-Sequenzen, die über eine Inhibition der TLR9-Signaltransduktionskaskade wirken, mögliche Therapeutika bei Autoimmunerkrankungen dar.

6. Literaturverzeichnis

1. Dutton RW. In vitro studies of immunological responses of lymphoid cells. *Adv Immunol* 1967; 6:253-336.
2. Unanue ER, Askonas BA. The immune response of mice to antigen in macrophages. *Immunology* 1968; 15:287-96.
3. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.
4. Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 2002; 32:1958-68.
5. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408:740-5.
6. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9237-42.
7. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. 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* 2002; 168:4531-7.
8. Kadowaki N, Antonenko S, Liu YJ. 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* 2001; 166:2291-5.
9. Vasilakos JP, Smith RM, Gibson SJ, Lindh JM, Pederson LK, Reiter MJ, Smith MH, Tomai MA. Adjuvant activities of immune response modifier R-848: comparison with CpG-ODN. *Cell Immunol* 2000; 204:64-74.
10. Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, Ozaki Y, Tomizawa H, Akira S, Fukuhara S. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 2002; 195:1507-12.
11. Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002; 3:499.
12. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC. Innate immune responses to LCMV infections: natural killer cells and cytokines. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 263:7-27.
13. Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:432-6.
14. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002; 169:6668-72.

Literaturverzeichnis

15. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003; 301:640-3.
16. Barton GM, Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:380-3.
17. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:103-10.
18. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11:443-51.
19. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:13766-71.
20. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:14459-63.
21. Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270:81-92.
22. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162:3749-52.
23. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000; 1:398-401.
24. Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeda K, Akira S. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 1999; 231:59-65.
25. Hornung V, Schlender J, Guenther-Biller M, Rothenfusser S, Endres S, Conzelmann KK, Hartmann G. Replication-dependent potent IFN- α induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *J Immunol* 2004; 173:5935-43.
26. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougères A, Endres S, Hartmann G. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11:263-70.
27. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res* 1987; 7:429-38.
28. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:571-611.
29. Pestka S. The human interferon alpha species and receptors. *Biopolymers* 2000; 55:254-87.

Literaturverzeichnis

30. Billiau A. Interferon-gamma in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7:25-34.
31. Ortaldo JR, Lang NP, Timonen T, Herberman RB. Augmentation of human natural killer cell activity by interferon: conditions required for boosting and characteristics of the effector cells. *J Interferon Res* 1981; 1:253-62.
32. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 1998; 8:591-9.
33. Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 1999; 189:521-30.
34. Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 2001; 14:461-70.
35. Muller M, Ibelgaufts H, Kerr IM. Interferon response pathways--a paradigm for cytokine signalling? *J Viral Hepat* 1994; 1:87-103.
36. Bogdan C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:419-24.
37. Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD, MacPherson GG. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 2000; 191:435-44.
38. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000; 191:411-6.
39. Finkelman FD, Lees A, Birnbaum R, Gause WC, Morris SC. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J Immunol* 1996; 157:1406-14.
40. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811.
41. Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 2001; 106:259-62.
42. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, de Saint-Vis B, Dezutter-Dambuyant C, Jacquet C, Schmitt D, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *Adv Exp Med Biol* 1997; 417:21-5.
43. Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2000; 192:219-26.
44. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284:1835-7.
45. Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195:695-704.
46. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:151-61.

Literaturverzeichnis

47. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001; 294:1540-3.
48. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:4-9.
49. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194:863-9.
50. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. 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* 2001; 31:3026-37.
51. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001; 106:255-8.
52. Lennert K, Remmele W. [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes.]. *Acta Haematol* 1958; 19:99-113.
53. Lennert K, Kaiserling E, Muller-Hermelink HK. Letter: T-associated plasma-cells. *Lancet* 1975; 1:1031-2.
54. Vollenweider R, Lennert K. Plasmacytoid T-cell clusters in non-specific lymphadenitis. *Virchows Arch B cell Pathol Incl Mol Pathol* 1983; 44:1-14.
55. Facchetti F, de Wolf-Peeters C, Mason DY, Pulford K, van den Oord JJ, Desmet VJ. Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am J Pathol* 1988; 133:15-21.
56. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137:1142-62.
57. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman RM. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; 82:487-93.
58. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997; 185:1101-11.
59. Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, Lund-Johansen F. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:12551-6.
60. Peter HH, Dallugge H, Zawatzky R, Euler S, Leibold W, Kirchner H. Human peripheral null lymphocytes. II. Producers of type-1 interferon upon stimulation with tumor cells, Herpes simplex virus and *Corynebacterium parvum*. *Eur J Immunol* 1980; 10:547-55.
61. Perussia B, Fanning V, Trinchieri G. A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1985; 4:120-37.
62. Chehimi J, Starr SE, Kawashima H, Miller DS, Trinchieri G, Perussia B, Bandyopadhyay S. Dendritic cells and IFN- α -producing cells are two functio-

Literaturverzeichnis

- nally distinct non-B, non-monocytic HLA-DR⁺ cell subsets in human peripheral blood. *Immunology* 1989; 68:488-90.
63. Sandberg K, Eloranta ML, Johannisson A, Alm GV. Flow cytometric analysis of natural interferon-alpha producing cells. *Scand J Immunol* 1991; 34:565-76.
 64. Feldman S, Stein D, Amrute S, Denny T, Garcia Z, Kloser P, Sun Y, Megjugorac N, Fitzgerald-Bocarsly P. Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin Immunol* 2001; 101:201-10.
 65. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; 5:919-23.
 66. Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2000; 192:1785-96.
 67. Bendriss-Vermare N, Barthelemy C, Durand I, Bruand C, Dezutter-Dambuyant C, Moulian N, Berrih-Aknin S, Caux C, Trinchieri G, Briere F. Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* 2001; 107:835-44.
 68. Comeau MR, Van der Vuurst de Vries AR, Maliszewski CR, Galibert L. CD123bright plasmacytoid predendritic cells: progenitors undergoing cell fate conversion? *J Immunol* 2002; 169:75-83.
 69. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. 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* 2001; 194:1823-34.
 70. Facchetti F, De Wolf-Peeters C, van den Oord JJ, De vos R, Desmet VJ. Plasmacytoid T cells: a cell population normally present in the reactive lymph node. An immunohistochemical and electronmicroscopic study. *Hum Pathol* 1988; 19:1085-92.
 71. Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M, Rothenfusser S, Wetzel S, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 2002; 119:1096-102.
 72. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:2154-63.
 73. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:3388-93.
 74. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3:196-200.
 75. Kadowaki N, Liu YJ. Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 2002; 63:1126-32.

Literaturverzeichnis

76. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 2000; 1:305-10.
77. Penna G, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2001; 167:1862-6.
78. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003; 19:225-34.
79. Rothenfusser S, Tuma E, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG(1). *Hum Immunol* 2002; 63:1111-9.
80. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283:1183-6.
81. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, Bhardwaj N. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2003; 101:3520-6.
82. Krug A, Veeraswamy R, Pekosz A, Kanagawa O, Unanue ER, Colonna M, Cella M. 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* 2003; 197:899-906.
83. Patterson S, Rae A, Hockey N, Gilmour J, Gotch F. Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J Virol* 2001; 75:6710-3.
84. Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, Qazi N, Gilmour J, Gotch F, Patterson S. Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 2001; 98:2574-6.
85. Soumelis V, Scott I, Gheyas F, Bouhour D, Cozon G, Cotte L, Huang L, Levy JA, Liu YJ. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 2001; 98:906-12.
86. Siegal FP, Fitzgerald-Bocarsly P, Holland BK, Shodell M. Interferon-alpha generation and immune reconstitution during antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection. *Aids* 2001; 15:1603-12.
87. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, Wei S, Krzysiek R, Durand-Gasselin I, Gordon A, Pustilnik T, Curiel DT, Galanaud P, Capron F, Emilie D, Curiel TJ. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001; 7:1339-46.
88. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, Wagner M, Wellisch D, Mack B, Giese T, Gires O, Endres S, Hartmann G. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 2003; 63:6478-87.
89. Cornall RJ, Goodnow CC, Cyster JG. The regulation of self-reactive B cells. *Curr Opin Immunol* 1995; 7:804-11.
90. Osmond DG, Rolink A, Melchers F. Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunol Today* 1998; 19:65-8.

Literaturverzeichnis

91. Liu YJ, Zhang J, Lane PJ, Chan EY, MacLennan IC. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol* 1991; 21:2951-62.
92. Krzysiek R, Lefevre EA, Zou W, Foussat A, Bernard J, Portier A, Galanaud P, Richard Y. Antigen receptor engagement selectively induces macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokine production in human B cells. *J Immunol* 1999; 162:4455-63.
93. Clark EA, Ledbetter JA. How B and T cells talk to each other. *Nature* 1994; 367:425-8.
94. Foy TM, Shepherd DM, Durie FH, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39. *J Exp Med* 1993; 178:1567-75.
95. Callard RE, Armitage RJ, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol Today* 1993; 14:559-64.
96. Dubois B, Vanbervliet B, Fayette J, Massacrier C, Van Kooten C, Briere F, Banchereau J, Caux C. Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J Exp Med* 1997; 185:941-51.
97. Dubois B, Massacrier C, Vanbervliet B, Fayette J, Briere F, Banchereau J, Caux C. Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J Immunol* 1998; 161:2223-31.
98. Fayette J, Durand I, Bridon JM, Arpin C, Dubois B, Caux C, Liu YJ, Banchereau J, Briere F. Dendritic cells enhance the differentiation of naive B cells into plasma cells in vitro. *Scand J Immunol* 1998; 48:563-70.
99. Fayette J, Dubois B, Vandenabeele S, Bridon JM, Vanbervliet B, Durand I, Banchereau J, Caux C, Briere F. Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2. *J Exp Med* 1997; 185:1909-18.
100. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. *Nat Immunol* 2002; 3:822-9.
101. MacLennan IC, Gulbranson-Judge A, Toellner KM, Casamayor-Palleja M, Chan E, Sze DM, Luther SA, Orbea HA. The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. *Immunol Rev* 1997; 156:53-66.
102. Ho F, Lortan JE, MacLennan IC, Khan M. Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur J Immunol* 1986; 16:1297-301.
103. Liu YJ, Arpin C. Germinal center development. *Immunol Rev* 1997; 156:111-26.
104. Dubois B, Barthelemy C, Durand I, Liu YJ, Caux C, Briere F. Toward a role of dendritic cells in the germinal center reaction: triggering of B cell proliferation and isotype switching. *J Immunol* 1999; 162:3428-36.
105. Liu YJ, de Bouteiller O, Fugier-Vivier I. Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:256-62.
106. MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:117-39.

Literaturverzeichnis

107. Hardie DL, Johnson GD, Khan M, MacLennan IC. Quantitative analysis of molecules which distinguish functional compartments within germinal centers. *Eur J Immunol* 1993; 23:997-1004.
108. Rousset F, Garcia E, Banchereau J. Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. *J Exp Med* 1991; 173:705-10.
109. Casamayor-Palleja M, Khan M, MacLennan IC. A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. *J Exp Med* 1995; 181:1293-301.
110. Liu YJ, Barthelemy C, de Bouteiller O, Arpin C, Durand I, Banchereau J. Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2. *Immunity* 1995; 2:239-48.
111. Sze DM, Toellner KM, Garcia de Vinuesa C, Taylor DR, MacLennan IC. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J Exp Med* 2000; 192:813-21.
112. Smith KG, Light A, Nossal GJ, Tarlinton DM. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *Embo J* 1997; 16:2996-3006.
113. Arpin C, Dechanet J, Van Kooten C, Merville P, Grouard G, Briere F, Banchereau J, Liu YJ. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 1995; 268:720-2.
114. Choe J, Choi YS. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur J Immunol* 1998; 28:508-15.
115. Kawano MM, Mihara K, Huang N, Tsujimoto T, Kuramoto A. Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escape from apoptosis. *Blood* 1995; 85:487-94.
116. Garcia De Vinuesa C, Gulbranson-Judge A, Khan M, O'Leary P, Cascalho M, Wabl M, Klaus GG, Owen MJ, MacLennan IC. Dendritic cells associated with plasmablast survival. *Eur J Immunol* 1999; 29:3712-21.
117. McHeyzer-Williams MG, Ahmed R. B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:172-9.
118. Maruyama M, Lam KP, Rajewsky K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature* 2000; 407:636-42.
119. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2:675-80.
120. Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: upregulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 2003.
121. Wagner H. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5:62-9.
122. Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, Payette P, Blackwell S, Suparto I, Rasmussen WL, Waldschmidt M, Sajuthi D, Purcell RH, Davis HL, Krieg AM. De-

Literaturverzeichnis

-
- lineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primary immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000; 164:1617-24.
123. Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000; 164:944-53.
 124. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop* 1991:3-11.
 125. Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 1994; 64:529-64.
 126. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. 1976. *J Urol* 2002; 167:891-3; discussion 893-5.
 127. Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72:955-62.
 128. Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, Tokunaga T. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol* 1992; 148:4072-6.
 129. Tokunaga T, Yamamoto S, Namba K. A synthetic single-stranded DNA, poly(dG,dC), induces interferon-alpha/beta and -gamma, augments natural killer activity, and suppresses tumor growth. *Jpn J Cancer Res* 1988; 79:682-6.
 130. Yamamoto T, Yamamoto S, Kataoka T, Tokunaga T. Ability of oligonucleotides with certain palindromes to induce interferon production and augment natural killer cell activity is associated with their base length. *Antisense Res Dev* 1994; 4:119-22.
 131. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:709-60.
 132. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374:546-9.
 133. Tamm I, Dorken B, Hartmann G. Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet* 2001; 358:489-97.
 134. Yamamoto T, Yamamoto S, Kataoka T, Tokunaga T. Lipofection of synthetic oligodeoxyribonucleotide having a palindromic sequence of AACGTT to murine splenocytes enhances interferon production and natural killer activity. *Microbiol Immunol* 1994; 38:831-6.
 135. Yi AK, Tuetken R, Redford T, Waldschmidt M, Kirsch J, Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol* 1998; 160:4755-61.
 136. Yi AK, Krieg AM. Rapid induction of mitogen-activated protein kinases by immune stimulatory CpG DNA. *J Immunol* 1998; 161:4493-7.
 137. Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *Embo J* 1998; 17:6230-40.

Literaturverzeichnis

138. Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Erdmann A, Hacker H, Heeg K, Wagner H. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α -mediated shock. *Eur J Immunol* 1997; 27:1671-9.
139. Hacker H. Signal transduction pathways activated by CpG-DNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 247:77-92.
140. Zimmermann S, Egeter O, Hausmann S, Lipford GB, Rocken M, Wagner H, Heeg K. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 1998; 160:3627-30.
141. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 1997; 186:1623-31.
142. Lipford GB, Bauer M, Blank C, Reiter R, Wagner H, Heeg K. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol* 1997; 27:2340-4.
143. Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 1998; 160:870-6.
144. Sun S, Zhang X, Tough D, Sprent J. Multiple effects of immunostimulatory DNA on T cells and the role of type I interferons. *Springer Semin Immunopathol* 2000; 22:77-84.
145. Chelvarajan RL, Raithatha R, Venkataraman C, Kaul R, Han SS, Robertson DA, Bondada S. CpG oligodeoxynucleotides overcome the unresponsiveness of neonatal B cells to stimulation with the thymus-independent stimuli anti-IgM and TNP-Ficoll. *Eur J Immunol* 1999; 29:2808-18.
146. Bauer M, Redecke V, Ellwart JW, Scherer B, Kremer JP, Wagner H, Lipford GB. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166:5000-7.
147. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:9305-10.
148. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401:708-12.
149. Rothenfusser S, Hornung V, Krug A, Towarowski A, Krieg AM, Endres S, Hartmann G. Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon- α /- β . *Eur J Immunol* 2001; 31:3525-34.
150. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 2002; 298:2199-202.
151. Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol* 2001; 166:2372-7.
152. Gursel M, Verthelyi D, Gursel I, Ishii KJ, Klinman DM. Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J Leukoc Biol* 2002; 71:813-20.

Literaturverzeichnis

153. Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S, Endres S. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33:1633-41.
154. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410:1107-11.
155. Wickstrom E, Tyson FL. Differential oligonucleotide activity in cell culture versus mouse models. *Ciba Found Symp* 1997; 209:124-37; discussion 137-41.
156. Dow SW, Fradkin LG, Liggitt DH, Willson AP, Heath TD, Potter TA. Lipid-DNA complexes induce potent activation of innate immune responses and anti-tumor activity when administered intravenously. *J Immunol* 1999; 163:1552-61.
157. Carpentier AF, Chen L, Maltonti F, Delattre JY. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res* 1999; 59:5429-32.
158. Carpentier AF, Xie J, Mokhtari K, Delattre JY. Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2469-73.
159. Heckelsmiller K, Beck S, Rall K, Sipos B, Schlamp A, Tuma E, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 2002; 32:3235-45.
160. Ballas ZK, Krieg AM, Warren T, Rasmussen W, Davis HL, Waldschmidt M, Weiner GJ. Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. *J Immunol* 2001; 167:4878-86.
161. Wooldridge JE, Ballas Z, Krieg AM, Weiner GJ. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood* 1997; 89:2994-8.
162. Jahrsdorfer B, Hartmann G, Racila E, Jackson W, Muhlenhoff L, Meinhardt G, Endres S, Link BK, Krieg AM, Weiner GJ. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol* 2001; 69:81-8.
163. Jahrsdorfer B, Jox R, Muhlenhoff L, Tschöep K, Krug A, Rothenfusser S, Meinhardt G, Emmerich B, Endres S, Hartmann G. Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG-ODN. *J Leukoc Biol* 2002; 72:83-92.
164. Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, Bidlingmaier M, Eigler A, Haimerl W, Lehr HA, Krieg AM, Hartmann G, Endres S. 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* 2000; 165:6278-86.
165. Heckelsmiller K, Rall K, Beck S, Schlamp A, Seiderer J, Jahrsdorfer B, Krug A, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G. 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* 2002; 169:3892-9.
166. Krieg AM. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat Med* 2003; 9:831-5.

Literaturverzeichnis

167. Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS, Krieg AM. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 1998; 160:2555-9.
168. Jain VV, Kitagaki K, Businga T, Hussain I, George C, O'Shaughnessy P, Kline JN. CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:867-72.
169. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998; 188:1679-89.
170. Jung J, Yi AK, Zhang X, Choe J, Li L, Choi YS. Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA. *J Immunol* 2002; 169:2368-73.
171. Nadler LM, Anderson KC, Marti G, Bates M, Park E, Daley JF, Schlossman SF. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *J Immunol* 1983; 131:244-50.
172. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Expression of cell surface markers after human B lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78:3848-52.
173. Goeckeritz BE, Flora M, Witherspoon K, Vos Q, Lees A, Dennis GJ, Pisetsky DS, Klinman DM, Snapper CM, Mond JJ. Multivalent cross-linking of membrane Ig sensitizes murine B cells to a broader spectrum of CpG-containing oligodeoxynucleotide motifs, including their methylated counterparts, for stimulation of proliferation and Ig secretion. *Int Immunol* 1999; 11:1693-700.
174. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002; 416:603-7.
175. Burdin N, Van Kooten C, Galibert L, Abrams JS, Wijdenes J, Banchereau J, Rousset F. Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J Immunol* 1995; 154:2533-44.
176. Braun D, Caramalho I, Demengeot J. IFN-alpha/beta enhances BCR-dependent B cell responses. *Int Immunol* 2002; 14:411-9.
177. Hibbert L, Foster GR. Human type I interferons differ greatly in their effects on the proliferation of primary B cells. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19:309-18.
178. Dubois B, Massacrier C, Caux C. Selective attraction of naive and memory B cells by dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2001; 70:633-41.
179. Dubois B, Bridon JM, Fayette J, Barthelemy C, Banchereau J, Caux C, Briere F. Dendritic cells directly modulate B cell growth and differentiation. *J Leukoc Biol* 1999; 66:224-30.
180. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164:5998-6004.
181. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166:249-55.

Literaturverzeichnis

182. Sornasse T, Flamand V, De Becker G, Bazin H, Tielemans F, Thielemans K, Urbain J, Leo O, Moser M. Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response in vivo. *J Exp Med* 1992; 175:15-21.
183. Inaba K, Steinman RM, Van Voorhis WC, Muramatsu S. Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80:6041-5.
184. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:1931-6.
185. Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, Aubry JP, Brunner T, Blasey H, Life P, Talbot D, Flores-Romo L, Thompson J, et al. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 1993; 365:340-3.
186. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391:591-4.
187. Grammer AC, Bergman MC, Miura Y, Fujita K, Davis LS, Lipsky PE. The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses. *J Immunol* 1995; 154:4996-5010.
188. Fagarasan S, Honjo T. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* 2000; 290:89-92.
189. Battegay M, Bachmann MF, Burhkart C, Viville S, Benoist C, Mathis D, Hengartner H, Zinkernagel RM. Antiviral immune responses of mice lacking MHC class II or its associated invariant chain. *Cell Immunol* 1996; 167:115-21.
190. Peters M, Ambrus JL, Zheleznyak A, Walling D, Hoofnagle JH. Effect of interferon-alpha on immunoglobulin synthesis by human B cells. *J Immunol* 1986; 137:3153-7.
191. Morikawa K, Kubagawa H, Suzuki T, Cooper MD. Recombinant interferon-alpha, -beta, and -gamma enhance the proliferative response of human B cells. *J Immunol* 1987; 139:761-6.
192. Neubauer RH, Goldstein L, Rabin H, Stebbing N. Stimulation of in vitro immunoglobulin production by interferon-alpha. *J Immunol* 1985; 134:299-304.
193. Colonna M, Krug A, Cella M. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:373-9.
194. Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004; 103:1433-7.
195. Byrnes AA, Ma X, Cuomo P, Park K, Wahl L, Wolf SF, Zhou H, Trinchieri G, Karp CL. Type I interferons and IL-12: convergence and cross-regulation among mediators of cellular immunity. *Eur J Immunol* 2001; 31:2026-34.
196. McRae BL, Nagai T, Semnani RT, van Seventer JM, van Seventer GA. Interferon-alpha and -beta inhibit the in vitro differentiation of immunocompetent human dendritic cells from CD14(+) precursors. *Blood* 2000; 96:210-7.
197. Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Rock J, Sohma Y, Winkels G, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol* 2002; 63:1133-48.

Literaturverzeichnis

198. Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* 2001; 14:661-4.
199. MacLennan I, Vinuesa C. Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity* 2002; 17:235-8.
200. Balazs M, Martin F, Zhou T, Kearney J. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 2002; 17:341-52.
201. Wagner M, Poeck H, Jahrsdoerfer B, Rothenfusser S, Prell D, Bohle B, Tuma E, Giese T, Ellwart JW, Endres S, Hartmann G. IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA. *J Immunol* 2004; 172:954-63.
202. Leadbetter EA, Rifkin IR, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors and activation of autoreactive B cells. *Curr Dir Autoimmun* 2003; 6:105-22.
203. Hemmi H, Kaisho T, Takeda K, Akira S. 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* 2003; 170:3059-64.
204. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, Giese T, Endres S, Hartmann G. 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* 2003; 170:4465-74.
205. Krieg AM. A role for Toll in autoimmunity. *Nat Immunol* 2002; 3:423-4.
206. Wang Y, Krieg AM. Synergy between CpG- or non-CpG DNA and specific antigen for B cell activation. *Int Immunol* 2003; 15:223-31.
207. Macfarlane DE, Manzel L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol* 1998; 160:1122-31.
208. Lenert P, Stunz L, Yi AK, Krieg AM, Ashman RF. CpG stimulation of primary mouse B cells is blocked by inhibitory oligodeoxyribonucleotides at a site proximal to NF-kappaB activation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2001; 11:247-56.
209. Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Efler SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis HL. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:12631-6.
210. Stacey KJ, Young GR, Clark F, Sester DP, Roberts TL, Naik S, Sweet MJ, Hume DA. The molecular basis for the lack of immunostimulatory activity of vertebrate DNA. *J Immunol* 2003; 170:3614-20.
211. Zeuner RA, Ishii KJ, Lizak MJ, Gursel I, Yamada H, Klinman DM, Verthelyi D. Reduction of CpG-induced arthritis by suppressive oligodeoxynucleotides. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2219-24.
212. Ronnblom L, Alm GV. The natural interferon-alpha producing cells in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 2002; 63:1181-93.
213. Williams RC, Jr., Malone CC, Meyers C, Decker P, Muller S. Detection of nucleosome particles in serum and plasma from patients with systemic lupus erythematosus using monoclonal antibody 4H7. *J Rheumatol* 2001; 28:81-94.

Literaturverzeichnis

-
214. Rumore PM, Steinman CR. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest* 1990; 86:69-74.
 215. Vallin H, Perers A, Alm GV, Ronnblom L. Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1999; 163:6306-13.
 216. Moss J, Shore I, Woodrow D, Gresser I. Interferon-induced glomerular basement membrane and endothelial cell lesions in mice. An immunogold ultrastructural study of basement membrane components. *Am J Pathol* 1988; 133:557-63.
 217. Ioannou Y, Isenberg DA. Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1431-42.

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
APC	Antigen-präsentierende Zellen
ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
APC	Allophycocyanin
APRIL	<i>A proliferation inducing ligand</i>
AS	Aminosäuren
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
BCR	B-Zell-Rezeptor
BDCA	<i>Blood dendritic cell antigen</i>
BlyS	<i>B-lymphocyte-stimulator</i>
Bp	Basenpaare
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw	beziehungsweise
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD40L	CD40 Ligand
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	Cytosin verbunden mit Guanin über eine Phosphatverbindung
CpG-ODN	CpG-Motive enthaltende Oligodesoxynukleotide
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i>
d	Tage
DC	Dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (cDNA)	(<i>complementary</i>) Desoxyribonukleinsäure
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FDC	Follikuläre dendritische Zellen
FITC	Fluorescein-Isocyanat
g	Zentripetalbeschleunigung der Erde
GC	<i>Germinal center (Keimzentrum)</i>
GCDC	Dendritische Zellen des Keimzentrums
G6PDH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H	<i>Heavy</i> (schwere) Kette eines Immunglobulins
HEV	<i>High endothelial venules</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
I.E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Int DC	Interstitielle dendritische Zellen
IPC	Interferon-produzierende Zellen
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kd	Kilodalton (Molekulargewicht)
L	<i>Light</i> (leichte) Kette eines Immunglobulins
LAL	<i>Limulus ameobocyte lysate</i>
LBP	LPS-bindendes Protein
LC	Langerhans-Zellen
Lin	<i>lineage</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MAb	Monoklonale Antikörper
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MAP	Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinasen
MDC	Myeloide dendritische Zelle
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min	Minute(n)
Mio	Million(en)
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
p	statistische Wahrscheinlichkeitskonstante
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll-A-Protein
pg	Pikogramm
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PT	Phosphorothioat
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Runden pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR von revers transkribierter RNA
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency syndrome</i>
SEM	<i>Standard error of means</i>
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
TCR	T-Zell-Rezeptor
TD	<i>Thymus-dependent</i>
TE	Tris-EDTA
TH	T-Helfer
TI	<i>Thymus-independent</i>
TIR	Toll/ Interleukin-1 Rezeptor-Domäne
TIRAP	<i>TIR domain-containing adapter protein</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF6	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter inducing IFN-β</i>
TTP	Thymidintriphosphat
U/ml	Units pro ml
UTP	Uridintriphosphat
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>

8. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres bedanke ich mich für die persönliche Unterstützung sowie 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 kontinuierliche Betreuung, Motivation und die herausragende Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich meinen Betreuern Prof. Dr. med. Gunther Hartmann und Dr. Simon Rothenfusser ausdrücklich danken.

Ferner gilt mein Dank Moritz Wagner für die methodische Anleitung, die Zusammenarbeit und seine freundschaftliche Unterstützung im Allgemeinen.

Ich möchte mich außerdem bei den Doktoranden Anja Marschner, Julia Battiany, Daniela Wellisch, Moritz Stuplich und Miren Kerkmann für die tatkräftige Unterstützung bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Eltern, Dr. Wolfgang und Christiane Poeck, für ihre liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums bedanken.

9. Publikationen

Originalarbeiten

2005

Sarris A, Rothenfusser A, Hornung V, Krug A, Kerkmann M, Wellisch D, **Poeck H**, Greinacher A, Giese T, Endres S and Hartmann G.
CpG-ODN enhance antigen-specific NKT cell activation via plasmacytoid dendritic cells.
European Journal of Immunology 2005; 33(6):1633-41; JIF 5.4

Jahrsdorfer B, Mühlenhoff L, Blackwell SE, Wagner M, **Poeck H**, Hartmann E, Jox R, Giese T, Emmerich B, Endres S, Weiner G, and Hartmann G.
B cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG-Oligonucleotides
Clinical Cancer Research 2005; 11(4):1490-99; JIF 6.5

2004

Poeck H, Wagner M, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G.
Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help.
Blood 2004; 103(8):3058-64; JIF 10.4

Wagner M, **Poeck H**, Jahrsdorfer B, Rothenfusser S, Prell D, Bohle B, Tuma E, Giese T, Ellwart JW, Endres S, Hartmann G.
IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA.
Journal of Immunology 2004; 172(2):954-63; JIF 7.3

2003

Hartmann G, Battiany J, **Poeck H**, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S, Endres S.
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; 33(6):1633-41; JIF 5.4

Abstracts und Poster

1. **Poeck H**, Wagner M, Wellisch D, Kerkmann M, Stuplich M, Endres S and Hartmann G
Plasmacytoid dendritic cells support CpG-induced B cell activation and plasma cell generation via direct cell-to-cell contact and soluble factors
FASEB, 2003 April; 17(7): Abstract 157.13
2. Wagner M, **Poeck H**, Jahrsdorfer B, Rothenfusser S, Bohle B, Tuma E, Giese T, Ellwart JW, Endres S and Hartmann G
IL-12p70 dependent Th-1 induction by human B cells requires combined activation with CD40L and CpG DNA
FASEB, 2003 April; 17(7): Abstract 77.4
3. Hartmann G, Battiany J, **Poeck H**, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S and Endres S
Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells
FASEB, 2003 April; 17(7): Abstract 32.8
4. Rothenfusser S, Wellisch D, Kerkmann M, Stuplich M, **Poeck H**, Sollner J, Endres S and Hartmann G
Signal transduction induced by CpG-A and CpG-B in PDCs
FASEB, 2003 April; 17(7): Abstract 158.5

Vorträge

- 2005 Hauptvortrag "CpG-DNA und isRNA: Wirkungen auf das humane Immunsystem"
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e.V., 01-05. Oktober 2005, Hannover
- Hauptvortrag "CpG-DNA und isRNA zur Steuerung des Immunsystems nach dem Muster viraler Infektion"
13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie und der Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Immunologie e.V., 26-28. Mai 2005, Düsseldorf
- 2004 "Plasmacytoid dendritic cells support CpG-induced B cell activation and plasma cell generation via direct cell-to-cell contact and soluble factors"
Vortrag zur Fortbildungsveranstaltung aller klinisch-experimentellen Forschungsgruppen an der Medizinischen Klinik Innenstadt, LMU

10. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Hendrik Poeck
 Geburtsdatum: 31.07.1976 in Stuttgart
 Nationalität: Deutsch

SCHULBILDUNG:

1984 – 1987 Erich-Kästner-Grundschule, Berlin
 1987 – 1994 Walther-Rathenau-Gymnasium, Berlin
 1994 – 1995 Grafton High School, Fairmont, West-Virginia, USA
 1997 Abitur am Walther-Rathenau-Gymnasium, Berlin

ZIVILDienst:

1997 – 1998 Pflegerische Aufgaben im Klinikum Großhadern, Abteilung für Hämatologie und Onkologie, LMU München

HOCHSCHULAUSBILDUNG:

1998 – 2000 Medizinstudium an der LMU München
 08/2000 Physikum
 08/2001 I. Staatsexamen
 2001 – 2002 Medizinstudium an der Universität von Salamanca, Spanien
 2002 Fortsetzung des Studiums an der LMU München
 2004 II. Staatsexamen
 2004– 2005 Praktisches Jahr:
Teil I
Innere Medizin am Beth Israel Deaconess Medical Center und Cambridge Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA
Teil II:
Allgemein- und Unfallchirurgie am Victoria Hospital, University of Cape Town, Kapstadt, Südafrika und am Krankenhaus Harlaching, LMU München
Teil III
Pädiatrie am Dr. von Haunerschen Kinderspital, LMU München
 2005 III. Staatsexamen

STIPENDIEN:

2001-2005 Stipendium der Fritz-ter-Meer-Stiftung
 2004 Stipendium der Munich-Harvard-Alliance for Medical Education